



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina**

**Escuela Profesional de Tecnología Médica**

**Comparación de los valores de células NKT en sangre  
periférica de pacientes con y sin infección por VIH-1**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología  
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

**AUTOR**

Renata Patricia VERASTEGUI TOPOVICH

**ASESOR**

César GUTIÉRREZ VILLAFUERTE

Segundo Ramos LEÓN SANDOVAL

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Verastegui R. Comparación de los valores de células NKT en sangre periférica de pacientes con y sin infección por VIH-1 [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2017.

---

1176



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA  
"AÑO DEL BUEN SERVICIO AL CIUDADANO"



13(e)  
66

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Conforme a lo estipulado en el Art. 45.2 y, Art. 100.13 de la Ley 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Directora de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

Presidente: Mg. José Antonio Paredes Arrascue  
Miembro : Mg. Heli Jaime Barrón Pastor  
Lic. Ricardo Mafalky Rodriguez Torres

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día 02 de agosto de 2017, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado **"COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE CÉLULAS NKT EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON Y SIN INFECCIÓN POR VIH-1"** Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión", para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica de la Bachiller:

**RENATA PATRICIA VERASTEGUI TOPOVICH**

Habiendo obtenido el calificativo de:

17  
(en números)



Diecisiete  
(en letras)

Que corresponde a la mención de:

Muy Bueno.

Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta.

Presidente  
Mg. José Antonio Paredes Arrascue

Miembro  
Mg. Heli Jaime Barrón Pastor

Miembro  
Lic. Ricardo Mafalky Rodriguez Torres

Asesor (a) de Tesis  
Dr. César Arturo Gutiérrez Villafuerte

**“Comparación de los valores de células NKT en sangre  
periférica de pacientes con y sin infección por VIH-1”**

**AUTOR:**

**Bachiller Verastegui Topovich, Renata Patricia**

**ASESOR:**

**Dr. Gutiérrez Villafuerte, César**

**CO-ASESOR**

**Mag. León Sandoval, Segundo Ramos**

## **DEDICATORIA**

A mi familia; especialmente a mi mamá. Gracias mami por apoyarme tanto y siempre creer en mí, te amo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi mamá, por siempre querer que llegue más lejos, por quererme tanto, por ser mi amiga, por apoyarme y acompañarme en todo.

A mi papá, hermano y toda mi familia, gracias por su comprensión y cariño.

A Jesús, por estar conmigo en los momentos más difíciles, por el tiempo, los consejos y el cariño. Gracias por tanto.

A mi profesor y amigo Segundo León, no hubiese podido presentar este trabajo sin su apoyo. Gracias por el tiempo, los consejos y tu amistad.

A mi asesor, el Dr. Cesar Gutiérrez por tomarse el tiempo para apoyarme.

A José Manuel, ya que sin su ayuda logística esto no sería posible.

A todos mis profesores, los que durante los cinco años de carrera me transmitieron conocimiento y enseñanzas no solo académicas.

A Dios, por haber puesto en mi camino a las personas correctas en el momento correcto y por darme la oportunidad de seguir adelante siempre.

A la vida, por enseñarme tanto. Por demostrarme que todo se puede superar y la fuerza viene de uno mismo.

## **ÍNDICE:**

TÍTULO-----	I
DEDICATORIA-----	III
AGRADECIMIENTO-----	IV
ÍNDICE -----	V
LISTA DE TABLAS-----	VIII
LISTA DE GRÁFICOS-----	IX
RESUMEN-----	X
ABSTRACT-----	XII
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN-----	1
1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES-----	2
1.2 IMPORTANCIA-----	10
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN-----	11
1.3.1 Objetivo general-----	11
1.3.2 Objetivos específicos-----	11
1.4 BASES TEÓRICAS-----	12
1.4.1 BASE TEÓRICA-----	12
1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS-----	14
1.4.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS-----	16
CAPÍTULO II: MÉTODOS-----	17
2.1 DISEÑO METODOLÓGICO-----	18



2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN-----	18
2.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN-----	18
2.1.3 POBLACIÓN DE ESTUDIO.-----	18
2.1 4 MUESTRA Y MUESTREO-----	18
2.1.4.1 Criterios de inclusión-----	19
2.1.4.2 Criterios de exclusión-----	19
2.1.5 VARIABLES-----	19
2.1.6 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS-	20
2.1.7 PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS-----	21
2.1.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS-----	22
CAPÍTULO III: RESULTADOS-----	23
CAPÍTULO IV: DISCUSION-----	32
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES-----	36
4.1 CONCLUSIONES-----	37
4.2 RECOMENDACIONES-----	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	38
ANEXOS -----	43
Anexo N°1: Procedimiento de compensación, control de calidad y procesamiento de muestras-----	44
Anexo N°2: Instructivo de la prueba MultiTEST CD3 FITC/CD16 + CD56 PE/CD45 PERCP/CD19 APC de Becton Dickinson -----	48



## **LISTA DE TABLAS**

**Tabla N°1:** Cantidad de participantes obtenidos de cada grupo y valores de principales leucocitos estudiados.

**Tabla N°2:** Resultados de análisis bivariado para recuento absoluto de células NKT.

**Tabla N°3:** Resultados de análisis bivariado para cada grupo de leucocitos.

## **LISTA DE GRÁFICOS**

**Gráfico N°1:** Gráfica de cajas que muestra los valores absoluto de células NKT en el grupo control y el grupo con infección por VIH.

**Gráfico N°2:** Gráfica de cajas que muestra los valores porcentuales de células NKT con respecto a los linfocitos totales en el grupo control y el grupo con infección por VIH.

**Gráfico N°3:** Gráfica de cajas que muestra los valores porcentuales de células NKT con respecto a leucocitos totales en el grupo control y el grupo con infección por VIH.

**Gráfico N°4:** Gráfica de cajas que muestra los valores absolutos de linfocitos con respecto a leucocitos totales en el grupo control y el grupo con infección por VIH.

**Gráfico N° 5:** Gráfica de cajas que muestra los valores absolutos de leucocitos totales en el grupo control y el grupo con infección por VIH.

## **RESUMEN**

**Introducción:** Las células NKT forman parte del sistema inmune innato y se caracterizan por poseer un TCR especial que es restringido por la molécula CD1d, la cual es expresada por diferentes células presentadoras de antígenos. Estas células toman importancia al actuar como lo hacen las células T reguladoras, ya que secretan citocinas Th1, Th2 y Th17, con lo que regulan la función de las demás células del sistema inmune. Su implicancia en cáncer, autoinmunidad e infecciones ha sido observada ampliamente. Se ha demostrado un papel importante en el curso de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, observándose en diferentes estudios una depleción de estas células, así como una función disminuida en individuos infectados; pudiendo ser una de las causas por las que se vería alterado el patrón de citocinas durante la infección. Si bien ya existen estudios al respecto no hay información de datos en nuestro país ni en la región sobre este tema.

**Objetivos:** comparar los valores absolutos y porcentuales de las células NKT en pacientes con VIH y controles normales, así como los otros conjuntos de linfocitos  
**Diseño:** estudio de tipo descriptivo, observacional, de corte transversal. **Institución:** realizado en los laboratorios de epidemiología molecular del instituto de medicina tropical de la UNMSM, con muestras recolectadas del hospital nacional Dos de Mayo.

**Muestra:** Muestras de sangre total anticoagulada con EDTA pertenecientes a una población mixta y sin rangos de edad, atendidos y diagnosticados con VIH en el servicio de infectología del Hospital Nacional Dos de Mayo y a una población control.

**Materiales y métodos:** Se determinaron las células NKT así como los demás subconjuntos celulares gracias a la técnica de citometría de flujo utilizando el reactivo MultiTEST CD3 FITC/CD16 + CD56 PE/CD45 PERCP/CD19 APC de BD y tubos Trucount para el recuento absoluto. Se utilizó el software del equipo Accuri C6 para la adquisición y análisis de las muestras. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando STATA 10 donde se determinó la normalidad de las variables con la prueba de Shapiro-Wilk y se realizó la prueba de t de student para comparar medias.

**Resultados:** Los recuentos absolutos de NKT en controles sanos son mayores que en pacientes infectados. Se obtuvo de medias 233.03 células/ $\mu$ L y 80.79 células/ $\mu$ L respectivamente, siendo las diferencias de estas estadísticamente significativas ( $p < 0.000$ ). Lo mismo ocurre con los valores porcentuales de este grupo celular. Del mismo modo se observa disminución en linfocitos totales y linfocitos CD3. Las células NK se mantienen en pacientes con VIH en este estudio.

**Conclusiones:** Las células NKT se ven disminuidas en pacientes recientemente infectados con VIH en comparación a un grupo control. No sucede lo mismo con células NK. Se recomienda que este estudio sea el primer paso a nuevos trabajos que involucre células NKT y VIH así como su implicancia en la aparición de infecciones oportunistas e nuestro país.

**Palabras clave:** VIH-1, SIDA, células NKT, respuesta inmune, citometría de flujo.

## **ABSTRACT**

NKT cells belong to the innate immune system and are distinguished because they have a special TCR which is restricted by the CD1d molecule and is expressed by different antigen presenting cells. These cells play an important role in regulating T cells because they secrete Th1, Th2 and Th17 cytokines; thereby they regulated the function of other cells of immune system. The implication they have in cancer, autoimmunity and infections has been widely observed. They have been shown an important role in the course of human immunodeficiency virus infection, since these cells have shown significant depletion as well as diminished function in infected individuals in different studies; that would modify the pattern of cytokines during infection. Although there are studies on this topic, there is no information in our country neither in the region.

**Objectives:** To compare the absolute and percentage values of NKT cells as well as the other lymphocytes subsets in HIV patients and normal controls. **Design:** descriptive, observational, cross-sectional study. **Institution:** carried out in the Molecular Epidemiology Laboratory of the Institute of Tropical Medicine at UNMSM, with samples collected from the Dos de Mayo National Hospital.

**Participants or Material:** blood samples anticoagulated with EDTA belonging to a mixed population with no age ranges, attended and diagnosed with HIV in the infectious disease department of Dos de Mayo National Hospital and to a control population.

**Materials and methods:** NKT cells and other cell subsets were determined by flow cytometry using the BD-CDCP FITC / CD16 + CD56 PE / CD45 PERCP / CD19 reagent and Trucount tubes for absolute counting. Accuri c6 software was used for the acquisition and analysis of samples. Statistical analysis was performed using STATA 10. Shapiro-Wilk test was used for normality test and the t-test of student was used to compare means.

**Results:** Absolute NKT counts in healthy controls were higher than in infected patients. A mean of 233.03 cells /  $\mu$ L and 80.79 cells /  $\mu$ L were obtained, with the

differences being statistically significant ( $p < 0.000$ ). The same result was obtained with the percentage values of these cells. Likewise, there is a decrease in total lymphocytes and CD3 lymphocytes. NK cells are maintained in HIV patients.

**Conclusions:** NKT cells are decreased in newly infected HIV patients compared to a control group. NK cells remain preserved and similar for both groups. It is recommended that this analysis should be considered as the first step to new studies which involved NKT cells and HIV, as well as a way to study the development of opportunistic infections in people living with HIV in our country.

**Keywords:** HIV-1, AIDS, NKT cells, immune response, flow cytometry.



# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN**

# **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

## **1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES**

A partir del reconocimiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en el año 1981, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) fue aislado e identificado en el año 1984 por el grupo de investigación liderado por Louis Montagnier (Francia, 1984) (1). Al principio, el SIDA se había caracterizado por afectar a individuos homosexuales, hemofílicos y heroinómanos; ocasionándoles la aparición de infecciones oportunistas y enfermedad por patógenos benignos. Sin embargo, el VIH puede afectar a cualquier persona que se exponga a las diferentes vías de transmisión. En el Perú, todavía existe una infección centralizada en ciertos grupos de riesgo (2).

El VIH se caracteriza por su tropismo hacia los linfocitos T y otras células que expresen el receptor CD4, lo cual causa una disminución de la capacidad del hospedero para enfrentar patógenos debido a la insuficiencia de su sistema inmune (3).

Al igual que los demás miembros de la familia Retroviridae, el VIH posee dos cadenas idénticas de ARN monocatenario envueltas por una cápside de forma icosaédrica que, a su vez, se encuentra rodeada por una doble membrana lipídica que incorpora como consecuencia de la gemación de la nueva partícula viral (3-5). Como parte de las características de esta familia de virus, el VIH posee tres genes que codifican las proteínas estructurales (gag), de la envoltura (env) y proteínas necesarias para la replicación viral (pol) (3-5). Asimismo, el virus presenta una serie de genes que expresan proteínas que favorecen la entrada del material genómico viral hacia el núcleo de la célula hospedera, la infectividad de la partícula viral, y otras funciones no muy bien caracterizadas. Es importante resaltar a la proteína Nef, que tiene la función de disminuir la expresión de la proteína CD4 en la célula huésped (1, 3, 5). El gen gag codifica la poliproteína precursora p55, que luego es clivada para formar las proteínas p17 (proteína de la matriz, que forma una capa por debajo de la doble capa lipídica del virus), p24 (formadora de la cápside viral) y la p7 (proteína de

la nucleocápside que se encuentra unida al genoma viral y que favorece la transcripción reversa) (3, 5).

Las dos proteínas de la envoltura, gp120 y gp41, forman heterodímeros agrupados de a tres en la membrana lipídica de la partícula viral y son necesarios para la unión y entrada del virus a la célula huésped. Para que el VIH pueda ingresar a una célula, necesita que esta exprese la proteína CD4, una glicoproteína monomérica de 58 kda, que de manera natural funciona como correceptor de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II durante el reconocimiento de antígenos extraños por parte de los linfocitos T. Esta glicoproteína es expresada en un gran número de células en distinta proporción (al menos 60 % de los linfocitos T circulantes, linfocitos T vírgenes de la médula ósea roja y el timo, macrófagos, monocitos, células de la microglia, entre otras) (3, 5).

Si bien la presencia de CD4 es indispensable para que el virus invada a la célula hospedera, no es el único requerimiento que deben de tener las células susceptibles a la infección, ya que para la unión a la célula blanco, estas necesitan expresar un receptor de quimioquinas. Existen varios receptores que han sido identificados como correceptores para el VIH, pero los más utilizados por este virus son el receptor de  $\alpha$ -quimioquinas CXCR4 y el de  $\beta$ -quimioquinas CCR5 (3, 5). La expresión de estas moléculas en células CD4+ es variable, la primera es expresada en una gran cantidad de células, mientras que la expresión de CCR5 está limitada a linfocitos T, macrófagos y células dendríticas. Los linfocitos T de memoria pero no los linfocitos T vírgenes de sangre periférica, expresan niveles considerables de CCR5, mientras que el CXCR4 se presenta con niveles altos en linfocitos T sanguíneos vírgenes y de memoria. Los linfocitos T de tejido linfoide como el GALT (Gut associated lymphoid tissue, tejido linfoide asociado al intestino) en el intestino son ricos en la expresión de CCR5 (3, 5).

Una vez que la gp120 se une a molécula CD4, esta sufre un cambio conformacional exponiendo un sitio para la unión al receptor de quimioquinas. El doble nexo de la gp120 con estas dos moléculas, se traduce en una unión más estable entre ambas células, permitiendo que la gp41 penetre la membrana y posteriormente a un cambio conformacional ambas membranas llegan a fusionarse (3, 5). Luego de la fusión, el

ARN y las demás proteínas necesarias son liberadas dentro del núcleo para la transcripción reversa y la duplicación del ADN viral, el cual finalmente es integrado al genoma de la célula hospedera gracias a la integrasa viral (3, 5).

La respuesta inmune innata del hospedero juega un papel crucial en la defensa contra el virus, pero también en el desarrollo de la infección por VIH. Tanto las barreras primarias, moléculas secretadas por estas y células inmunes que se encuentran en las mucosas, pueden frenar la infección, pero al mismo tiempo se ha identificado que algunos de estos elementos son necesarios para establecer la enfermedad, debido a las características innatas del virus y a la capacidad que posee el VIH para evadir elementos de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa (6, 7).

Las células NKT son células pertenecientes al sistema inmune innato que poseen propiedades inmunes especiales y que llevan su nombre por poseer características tanto de células NK como de linfocitos T (8). Si bien ya habían sido descritas como un subconjunto de linfocitos T murinos que presentaban un TCR (receptor de células T) con una expresión mayor de la cadena Vb8 en comparación con los otros conjuntos de linfocitos y no expresaban CD4 o CD8 (8); el término linfocitos NKT fue recién utilizado en 1995 para referirse a linfocitos T de ratones que expresaban el marcador de células NK, NK1.1 (8-10). Según como han avanzado las investigaciones que involucran a estas células, el término de células NKT ha ido evolucionando a lo largo de los años, considerando ahora dentro de este grupo a células T restringidas por la molécula CD1d (ver adelante). Adicionalmente, ahora se identifican grupos celulares parecidos a las células NKT que parecen ser estados de maduración previos o ser grupos celulares que tendrían funciones diferentes (11, 12).

El TCR especial que expresan las células NKT posee aminoácidos hidrofóbicos en su sitio de unión, lo que les permite reconocer antígenos de origen lipídico (8, 9). Solo reconocen antígenos de esta naturaleza presentados por células presentadoras de antígeno (APCs) a través de la molécula CD1d (8, 9). Las proteínas no polimórficas CD1 que también incluyen CD1a, CD1b, CD1c y CD1e son moléculas que comparten homología y estructura con las moléculas del CMH I. Poseen una cadena pesada con tres dominios extracelulares (alfa 1, alfa 2 y alfa 3) que se encuentra enlazada a través de una unión no covalente con una cadena ligera beta2-

microglobulina (13). Esta molécula se expresa sobre todo en células sanguíneas, pero también está presente en células no sanguíneas como células epiteliales del timo, y el endotelio (13).

Las células NKT pueden ser divididas en dos tipos diferentes según las características del TCR que posean y la reactividad que presentan frente a ciertos antígenos lipídicos (11, 14, 15): las de tipo I que expresan un receptor TCR invariante y son activadas por el  $\alpha$ -galactosilceramida y las del tipo 2 que poseen un TCR más diverso y se activan con otro grupo de antígenos (8, 11, 16-18). Además, según la expresión de CD4 o CD8 se pueden dividir en cuatro subpoblaciones: CD4+/CD8-, CD4-/CD8 $\alpha\alpha$ +, CD4-/CD8 $\alpha\beta$ + y CD4-/CD8- (8). Si bien los dos tipos son restringidos por la proteína CD1d, las del tipo I, también llamadas NKT invariantes poseen características particulares que las diferencian del segundo grupo. Su característica principal, y por la cual deben su denominación, es la expresión de la cadena alfa con el rearreglo V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 y una cadena beta V $\beta$ 11 casi siempre invariante (18). Expresan, en conjunto con CDs propios de células NK, marcadores de células T efectoras como el CD45ro (8).

El primer antígeno que se reconoció como ligando de las células NKT es la molécula artificial  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ -galcer), una glicosilceramida extraída primeramente de la esponja *Agelasphins mauritanus*. A pesar de no ser un ligando natural, esta molécula activa de manera bastante efectiva a las células NKT y se ha evaluado su actividad terapéutica en pacientes con cáncer y enfermedades inmunes. Se ha podido identificar que antígenos bacterianos como el galactosyl diacylglycerol de *Borrelia burgdorferi* o el phosphatidilinositol tetramannosido de *Mycobacterium leprae* pueden activar a las células NKT. Además, se sugiere que moléculas lipídicas intracelulares propias, podrían activar estas células cuando se encuentran de manera extracelular (8, 16, 18). De estas conjeturas se asume el importante papel que jugarían en cáncer, autoinmunidad e infecciones por virus y bacterias

Es importante mencionar que la activación de las células NKT se realiza tanto de manera directa como indirecta. La primera se presenta cuando antígenos lípidos bacterianos, parasitarios o provenientes de virus son presentados directamente por las células presentadoras de antígenos a estas células trayendo como consecuencia su

activación. La segunda se lleva a cabo debido a la presentación de lípidos endógenos presentados por las APC y activación mediante citocinas secretadas por estas, esto debido a la interacción de agonistas de los TLR con los TLR en la membrana de la célula presentadora de antígenos. Ambas vías requieren la presentación de antígenos lipídicos por parte de la molécula Cd1b en la célula APC al TCR de la célula NKT (18).

Se empezó a tomar atención a este grupo de células por la gran habilidad que se demostró que tenían para la secreción de citocinas, tanto Th1 como Th2. Dentro de las primeras se encuentra el INF-gamma y el TNF-beta, mientras que dentro del segundo grupo secretan IL-4, IL-10 e IL-13. Adicionalmente secretan IL-2, (TGF)-beta entre otras citocinas. La producción de citocinas se genera inmediatamente después de la activación de las células para luego cesar su secreción. El grado de activación y el perfil de citocinas producidas va a depender del contexto en que son activadas, por ejemplo, el compromiso de moléculas coestimuladoras como CD28 o CD40L pueden modular su activación; del mismo modo, distintos agonistas pueden influir en el perfil de secreción de citocinas (18).

Las células NKT se relacionan de manera importante con células tanto del sistema inmune innato como adaptativo. Estimulan potentemente las funciones de las células dendríticas, promueven la activación de células NK, neutrófilos, macrófagos, así como de linfocitos B y T. Regulan la diferenciación de linfocitos T CD4 vírgenes hacia células Th efectoras (18).

La importancia de estas células en el curso de infecciones por retrovirus se evidencia en el trabajo de Littwitz-Salomon (19), donde se utilizó el modelo en ratones Friend Virus. Como resultado se concluyó que los diferentes subconjuntos de NKT (CD4+, CD8+ y DN) generan una respuesta diferente frente al virus, esta puede ser inmunosupresora, inmunoestimuladora o citotóxica. En la fase inicial de la infección en ratones, la respuesta inmunosupresora caracterizada por aumento de citocinas IL-10 e IL-13 así como la actividad citotóxica de estas células se ve aumentada. También se pudo concluir que la estimulación de estas células con el ligando  $\alpha$ -galactosilceramida, aumenta la activación celular y disminuye la carga viral en los órganos afectados.

En los últimos años, se ha tomado interés en investigar el comportamiento que presentan estas células frente al virus de la inmunodeficiencia humana y se ha podido demostrar que juegan un papel importante tanto en el establecimiento de la infección como en la defensa contra este. Además de expresar CD4, para que una célula sea susceptible a la infección por VIH, ésta necesita expresar el receptor CCR5 o CXCR4. Sandberg encontró que un 93.4% de las NKT CD4- y 33.3% de las NKT CD4+ expresaban CCR5 y que la mayoría de ambos grupos expresaba CXCR4. El subconjunto CD4+ expresa CD62L por lo que migra hacia los nódulos linfáticos mientras que las CD4- expresan el receptor CD11a por lo que se infiltran a los tejidos. En su estudio se concluyó que la depleción estaría limitada a CD4+ (20).

Fernández y colaboradores (2009) encontraron en macacos infectados con SIV un patrón de expresión similar a lo encontrado por Sandberg. La expresión de CCR5 en NKT de humanos es variable, el CXCR4 es casi ubicuo (21). En otro estudio, Fernández y colaboradores (2014) llegaron a la conclusión que la disminución de NKT CD4+ se correlaciona con la disminución de CD4+ T totales pero no predice la pérdida total de células T CD4 de la fase crónica. El aumento de células T CD4 activadas se correlaciona con la disminución de células NKT en la infección temprana. La función de las NKT se ve afectada en lo que respecta a la secreción de INF gama (8, 22).

Motsinger y colaboradores (2002) demostraron que ambas variantes, con tropismo por CCR5 y CXCR4 eran capaces de infectar tres cultivos de NKT en estado activo y de reposo. Esos cultivos fueron más susceptibles a la variante CCR5. La expresión de esta molécula fue mayor y las células activadas con  $\alpha$ -galcer fueron más susceptibles al virus (23). Su estudio demuestra que ya sea en estado de reposo o activadas con  $\alpha$ -galcer, las células NKT expresan altos niveles de receptores de quimioquinas, esto incluye los correceptores CCR5 y CXCR6. Las familias de estos receptores se expresan de manera diferente en los subconjuntos de linfocitos T vírgenes y de memoria. La familia de receptores CC se presenta principalmente en los linfocitos T activados/de memoria, mientras que el CXCR4 y CCR7 se expresa en niveles mayores en linfocitos T vírgenes. Dependiendo de la expresión de CCR7 los linfocitos de memoria se han separado en dos subconjuntos. Las células de memoria

CCR7- no presenta el receptor CD62L, que es necesario para su desplazamiento hacia las glándulas linfáticas, por lo que migran hacia los diferentes tejidos y sitios de infección. Ocurre lo opuesto con las CCR7+. Las células NKT en reposo o activadas presentan una expresión CCR7-CCR5+CXCR6+ con lo que se encuentran en los órganos y lugares de infección por lo que serían más susceptibles a la infección por el VIH (23). El estudio también concluye que las células NKT activadas o en reposo positivas para el marcador CD4 son más susceptibles a la infección que las células TCD4+ convencionales (23). También demuestran la disminución de células NKT en pacientes VIH comparados con controles sanos. No se conoce la razón de la disminución de las NKT CD4-. Se sugiere que la activación in vivo daría como resultado la apoptosis de estas células, la cual es dependiente de IL-12 por lo que se presume que la activación de estas células en la infección por VIH resultaría en una muerte celular programada. Si bien en otras infecciones como la causada por *listeria monocytogenes*, las células NKT disminuyen cuantitativamente, se recuperan en el transcurso de la infección, lo cual no ocurre durante la infección por el VIH donde la disminución de las células permanece, situación que es atribuida a la estimulación crónica por parte del virus o a la desaparición de precursores NKT (23). Los mismos autores también demostraron que el SIV es capaz de disminuir las NKT CD4+ por un mecanismo de citólisis (24).

Fleuridor y colaboradores (2003) demostraron la capacidad de la variante CCR5 para infectar a leucocitos NKT. En su estudio observaron que la cinética de producción viral demora 7 días más en comparación con la producción de VIH en linfocitos primarios CD4+ (25). Debido a que la variante CCR5 es la forma predominante de transmisión de VIH y la variante CXCR4 se presenta en etapas posteriores de la infección, se puede concluir que las células TNK CD4+ podrían disminuir debido a la infección directa por parte del VIH.

En etapas tempranas de la infección por VIH/SIV, se ha demostrado que las células NKT pueden sufrir una disminución numérica y esta es atribuida a la capacidad que tiene el virus para infectar al subconjunto CD4+ (9, 20, 26).

Van der Vliet y colaboradores (2002) mostraron que los niveles de NKT Valpha24+Vbeta11+ estaban disminuidos en pacientes VIH crónicos



independientemente de la carga viral, conteos de CD4+ y ratio CD4/CD8. La mayor proporción de la disminución de estas células se observó durante el primer año después de la seroconversión. Debido a que encontraron que la ocurrencia de CD4+ y CCR5 en las NKT se presenta en un pequeño porcentaje en comparación con la expresión de moléculas Fas (CD95). La muerte celular apoptótica programada por la unión de fas/fasL que es mediada por activación de caspasas, es un factor importante en la depleción de células T en la infección por VIH, con lo que sugieren que la disminución se debía a la muerte inducida por activación de estas moléculas en vez de ser causada por la infección directa de las células NKT (26).

Demin Li y Xiaoning Xu (2008) mencionaron que las células NKT infectadas con la variante CCR5 son más eficientes en lo que respecta a replicación viral. Las NKT activadas producen 10 a 20 veces más partículas víricas y 10 veces más virus infecciosos que las células T convencionales activadas. Parecen jugar un rol en el establecimiento de la infección (9). Los diferentes subconjuntos tienen diferentes mecanismos por los cuales disminuyen. No se conoce la distribución de las células NKT CD4+ en el GALT, pero se cree que su disminución sigue una vía similar a los linfocitos T CD4+ ya que se ha demostrado que el VIH infecta directamente a las NKT (9). En la fase crónica de la infección por el VIH, su disminución sería consecuencia de la activación de la muerte celular inducida por el virus también como causa de la infección lítica (9). Probablemente la activación celular inapropiada es la razón principal por la cual las TNK CD4- disminuyen. Existen otras posibilidades tales como la redistribución y secuestro en los nódulos linfáticos (9). Por su papel inmunoregulatorio, la disminución de las células NKT facilitaría el establecimiento y persistencia de la infección además de contribuir al debilitamiento de la inmunidad del huésped y aparición de infecciones oportunistas (9). Con el tratamiento antiretroviral de gran actividad “TARGA” aún existe infección crónica por el virus en el GALT. El artículo menciona que podría ser la razón por la cual el subconjunto CD4- se recupera más rápidamente que el CD4+, mencionando además que la adición de IL-2 mejora su recuperación (9).

En nuestro país, no existen investigaciones que estudien los valores de las células NKT en sangre periférica en ninguna de las etapas de la infección por VIH. Por lo

tanto, un estudio de este tipo abre nuevas posibilidades de investigación en este campo.

### **Problema de investigación:**

**¿Cuáles son los valores de células NKT en sangre periférica de pacientes con y sin infección por VIH-1?**

## **1.2 IMPORTANCIA**

En 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) señaló que más de 36 millones de personas en el mundo viven infectadas con VIH, infección que en el año 2015 cobró 1.1 millones de muertes (27). En Perú en el 2016 se notificaron 4510 casos de VIH y 861 casos de sida (28), así mismo las últimas estadísticas indican que unas 1106 personas murieron a causa de la enfermedad para el año 2011 (2). A pesar que los fármacos antirretrovirales desarrollados detienen el avance del virus y aumentan la esperanza de vida de las personas infectadas estos no eliminan la infección y lamentablemente, debido a la capacidad de mutación del virus, tarde o temprano, este genera resistencia contra las drogas existentes (7, 29). Si bien se han realizado numerosos esfuerzos por hallar una vacuna contra el virus, aun no se han logrado resultados (7, 29).

Es conocido que el VIH logra burlar las defensas naturales y evade su eliminación del organismo (7, 29), por estos motivos es esencial entender de qué manera el sistema inmune reacciona contra este sobre todo conocer qué células resultan alteradas o ayudan a combatir la infección. Actualmente la respuesta inmune adaptativa contra el VIH es bien comprendida y se han venido realizando estudios sobre cómo las respuestas innatas actúan frente a la infección (6). Dentro de estas investigaciones se ha tomado interés en entender cuáles son los mecanismos mediante los cuales las células NKT, caracterizadas por responder frente a antígenos lipídicos, parecerían sucumbir ante la infección primaria a pesar de jugar un rol importante en la lucha del organismo contra la infección y el desarrollo de infecciones oportunistas que caracterizan al estadio SIDA (9, 30).

A pesar que ya existe estudios que como los de Fernandez y colaboradores que determinan la disminución selectiva de estas células durante los primeros meses luego de la seroconversión (21, 26, 30), no existen datos de nuestro país, por lo cual es importante corroborar con estudios previos. Esto es un paso para próximos estudios donde se podría evaluar no solo el aumento o disminución según la etapa de la enfermedad, sino también las condiciones mediante las cuales se puede prevenir la depleción y disminución de función de estas células lo que favorecería una progresión a largo plazo. Además se ha sugerido que estas células podrían utilizarse de alguna manera en la terapia contra este virus.

### **1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Determinar si existen diferencias entre la población de células NKT en pacientes diagnosticados con VIH sin recibir tratamiento y en personas sin infección por VIH

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

1. Determinar el recuento porcentual y absoluto de linfocitos totales y de sus subpoblaciones; y si estos se encuentran alterados en pacientes recientemente diagnosticados con VIH.
2. Describir los cambios en el recuento porcentual y absoluto de linfocitos totales así como de sus subpoblaciones.
3. Comparar los valores de leucocitos totales en ambos grupos.

## 1.4 BASES TEÓRICAS

### 1.4.1 BASE TEÓRICA

Las células NKT (natural killer T cells) son un subconjunto de células del sistema inmune innato identificadas inicialmente en ratones en el año 1995 (8, 16). Estas, son células CD3+ que además poseen características y marcadores propios de células NK (16-18). La característica principal de estas células es su activación frente a la  $\alpha$ -galactosilceramida, un compuesto lipídico extraído de una esponja marina, el cual es presentado por las células presentadoras de antígenos (APC) utilizando la molécula CD1d en lugar de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (16, 18, 31).

La determinación de las células NKT se realiza mediante la técnica de citometría de flujo (5, 26, 27). Ya que estas expresan el marcador CD3, propio de linfocitos T, así como marcadores de células NK como Cd161, Cd56 y CD16 (15, 16), estos se utilizan para la identificación de estas células.. La identificación específica de las células NKT de tipo I se realiza gracias a las características de su TCR, utilizando marcadores específicos para las porciones no variantes o mediante su unión específica al  $\alpha$ -galactosilceramida (31, 32). Debido a que la identificación de cada subconjunto sobrepasa los objetivos de este estudio y a que la población de NKT tipo I es mínima se considerará a las células NKT como células CD3+CD16/CD56+CD19- (33). Es cierto que existen células que no son NKT con estas características pero es un porcentaje muy pequeño (16, 18, 34).

Las células NKT funcionan como un nexo entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa al secretar diferentes citocinas que incluyen al INF- $\gamma$ , IL-4 y TNF- $\beta$ , las cuales van a activar y permitir la acumulación de células NK, linfocitos T y APC en el lugar donde se requiera. Las citocinas secretadas son del tipo Th1 (T helper 1) como Th2 (T helper 2), por lo que se les atribuye una función inmunoreguladora (16).

Varios estudios han demostrado que las células NKT juegan un rol importante durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (9, 30). Las

células NKT son muy susceptibles a la infección por este virus y su disminución, tanto en número como en función, será determinante para el establecimiento de la infección. Por otro lado, las citocinas que secretan las células NKT ayudarían a combatir la propagación del virus, así como también a evitar las infecciones oportunistas que aparecen durante el estadio SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Por lo tanto, un descenso de estas células, sería perjudicial para los pacientes infectados por el VIH (9, 20, 26).

Algunos estudios han encontrado que las células NKT disminuyen en los primeros meses luego de la seroconversión (22, 25, 30), sin embargo, estos niveles se verían aumentados luego del inicio de la terapia TARGA (35). Por otro lado, diferentes investigaciones han reportado que las células NKT tendrían un comportamiento similar a los linfocitos T CD4+ con respecto a su recuperación (17).

Debido a que las células NKT tienen un papel importante en combatir la infección, se ha demostrado que el mantenimiento de los niveles y función adecuada de estas células favorecería la progresión a largo plazo de la enfermedad convirtiéndose además en un objetivo terapéutico (17, 20).

### 1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

**CD:** Cluster of differentiation, es una nomenclatura con la que se designa a moléculas de superficie que se utilizan como marcadores útiles para la clasificación e identificación de leucocitos. Esta nomenclatura empezó en 1982 y fue desarrollada y es mantenida por el Human Leukocyte Differentiation Antigens workshop.

**CD3:** Proteínas formadas por las cadenas  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ . Las cuales poseen dominios ITAM que se encargan de transmitir las señales provenientes de la interacción del TCR y el antígeno.

**CD4:** Glicoproteína transmembrana de 55KDa perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Funciona como un correceptor de señalización y adhesión en la activación de linfocitos T restringidos por el MHC de clase II.

**CD8:** Heterodímero formado por una cadena  $\alpha$  y  $\beta$ , perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas. Funciona como un correceptor de señalización y adhesión en la activación de linfocitos T restringidos por el MHC de clase I.

**CD16:** Receptor de baja afinidad para la fracción Fc de la IgG. Participa en la fagocitosis y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

**CD19:** Glicoproteína transmembrana de 95 KDa que aparece tempranamente durante la maduración de los linfocitos B y se mantiene en estas células maduras. Participa en la activación de los linfocitos B.

**CD45:** Glicoproteína de 240 kDa expresada en la mayoría de células hemáticas maduras e inmaduras.

**CD56:** También conocida como NCAM (neural cell adhesion molecule), es una glicoproteína de superficie de 180 kD codificada por un gen localizado en el cromosoma 11. Su rol principal es el de participar en adhesión célula-célula, pero también se le ha considerado como un receptor de señalización que tiene impacto en la adhesión, migración, proliferación, apoptosis, diferenciación y supervivencia celular, así como en la plasticidad sináptica.

**Célula presentadora de antígeno (APC):** Células que muestran sobre su superficie y unidas a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de tipo II, fragmentos de antígenos proteicos para presentarlos y activar de esta manera a los linfocitos T.

**Célula NK:** Población de linfocitos no T, no B, granulares y de gran tamaño que se desarrollan mayoritariamente en médula ósea y luego entran a circulación. Estas células representan del 10–15% de las células mononucleares de sangre periférica. Las células NK tienen importancia en la inmunidad innata contra virus y otros agentes patógenos intracelulares y en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), también en la inmunidad antitumoral.

**Citometría de flujo:** Método de análisis, mediante el cual se pueden determinar las características físicas y químicas de un flujo de células, o partículas, en suspensión cuando estas pasan a través de un haz luminoso. Las señales individuales son detectadas por el equipo, el cual genera información de tamaño, complejidad y patrón de fluorescencia si se agregó algún marcador fluorescente.

**Coestimulador:** Molécula de membrana o de secreción de las APC y que suministra la segunda señal necesaria (antígeno, primera señal) para la activación de los linfocitos T vírgenes.

**Complejo principal de histocompatibilidad (MHC):** Conjunto de genes bastante polimorfos que en el humano se encuentran en el cromosoma 6. Estos se encargan de codificar a los péptidos que presentan los antígenos a los linfocitos T. También en este locus se encuentran genes que expresan citocinas, proteínas del complemento y moléculas relacionadas con el procesamiento del antígeno.

**Linfocito T:** Tipo de célula que interviene en las respuestas celulares de la inmunidad adaptativa. Maduran en el timo y luego ocupan los tejidos linfoides secundarios. Poseen un receptor de linfocitos T que reconoce fragmentos peptídicos del antígeno presentado por el MHC propio.

**Linfocitos Th1:** Subconjunto de linfocitos T cooperadores CD4+ que secreta INF-gamma. Estimula las respuestas contra organismos intracelulares al favorecer la activación de los fagocitos macrófagos.

**Linfocitos Th2:** Subconjunto de linfocitos T cooperadores CD4+ que secreta IL-4 e IL-5. Estimula la eliminación de parásitos helmintos al favorecer las respuestas que ocurren a través de IgE y basófilos y mastocitos.

**Receptor de linfocitos T (TCR):** Heterodímero proteico responsable del reconocimiento antigénico presente en los linfocitos T. Puede ser de tipo  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$  dependiendo de las cadenas peptídicas que lo conforman. El de tipo  $\alpha\beta$  es el más común y se genera por recombinación genética en los linfocitos T.

**Receptor de quimiocinas:** Receptores de superficie para las quimiocinas que intervienen en la migración de leucocitos.

**Respuesta inmune:** Reacción conjunta y coordinada del sistema inmune frente a la entrada de sustancias ajenas.

**Sistema inmune:** Células y moléculas responsables de la ejecución de la inmunidad, es decir, de la protección del individuo contra organismos extraños.

### **1.4.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS**

Se postula que habrá una variación significativa entre los valores de células NKT entre las personas con y sin infección por VIH-1. Siendo los valores de estas células en las personas con infección significativamente menor a los encontrados en el grupo control.



## **CAPÍTULO II**

### **MÉTODOS**

## **CAPÍTULO II: MÉTODOS**

### **2.1 DISEÑO METODOLÓGICO**

#### **2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN**

Estudio cuantitativo, descriptivo.

#### **2.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

Estudio de tipo observacional, de corte transversal, prospectivo.

#### **2.1.3 POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Se trabajó con una población mixta y sin rangos de edad, atendidos y diagnosticados con VIH en el servicio de Infectología del Hospital Nacional Dos de Mayo. Adicionalmente se trabajó con una población control, conformada por voluntarios sanos que rotan o trabajan en el Laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Medicina Tropical de la UNMSM y que aceptaron participar en el estudio.

#### **2.1 4 MUESTRA Y MUESTREO**

Se analizaron muestras de sangre periférica anticoaguladas con EDTA dipotásico, transportadas y almacenadas a temperatura ambiente.

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia condicionado por la disponibilidad de reactivos, materiales y pacientes.

Se aceptaron todas las muestras seropositivas que cumplieran con los criterios de inclusión. El número de muestras recolectadas fue de 50, pero por la demora en el tiempo de transporte solo se pudo procesar 44.

Adicionalmente se procesaron 15 muestras controles, colectadas de voluntarios sanos. Se procesaron un total de 69 muestras.

El tamaño muestral se vio limitado debido a la cantidad de reactivo que se dispuso para el análisis de las muestras y a la disponibilidad de pacientes y controles.

Se contó con dos cajas de reactivo Multitest (ver Anexo 2), cada uno para 50 determinaciones. Adicionalmente se contó solo con 3 bolsas de tubos TruCount (ver Anexo 3), los cuales son necesarios para determinar el número de células, cada bolsa contiene 25 tubos. Se prefirió trabajar con más muestras patológicas.

#### **2.1.4.1 Criterios de inclusión**

- Muestras de pacientes de ambos sexos, mayores de 18 años que hayan sido atendidos en el servicio de Infectología del Hospital Nacional Dos de Mayo y que hayan aceptado participar en el estudio.
- Muestras de pacientes que hayan sido diagnosticados recientemente con VIH mediante (ELISA y confirmación por Western blot).
- Muestras de sangre total anticoagulada con EDTA con no más de 24 horas de extracción.

#### **2.1.4.2 Criterios de exclusión**

- Muestras de pacientes que tomaron algún fármaco retroviral antes de la toma de muestra.
- Muestras de pacientes que ya habían iniciado su tratamiento antirretroviral
- Muestras que presentaron coágulos o volumen inadecuado.
- Muestras que se hayan congelado durante su traslado o almacenamiento.

#### **2.1.5 VARIABLES**

Infección por VIH: variable independiente

- Definición conceptual: Infección causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la cual va destruyendo gradualmente células del sistema inmune

del individuo infectado causando inmunodeficiencia hasta llegar a la fase conocida como SIDA.

- Definición operacional: Muestra de sangre total de paciente con pruebas positivas de Elisa y Western blot para el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1.
- Dimensión: Evidencia de ambas pruebas positivas y sin un diagnóstico previo de la enfermedad.
- Indicadores: Sí / No

Valores de células NKT en sangre periférica: variable dependiente

- Definición conceptual: células T dependientes de CD1d que pueden o no expresar el TCR invariante V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 y/o CD161
- Definición operacional Porcentaje y cantidad por uL de células identificadas como células NKT por citometría de flujo (CD3+, CD56CD16+)
- Dimensión: Porcentaje de células NKT totales / Valor absoluto de células NKT totales
- Indicadores: 0-100 % / 0-200 células /mm<sup>3</sup>

## **2.1.6 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

Las muestras de individuos infectados recientemente con VIH y que aceptaron participar en el estudio fueron colectadas en el servicio de Infectología del Hospital Nacional Dos de Mayo como parte de los procedimientos de rutina que se realizan a estos pacientes. El consentimiento informado quedó en custodia del servicio de infectología. No se tuvo acceso a nombres ni a datos de los pacientes, solo a muestras identificadas mediante códigos numéricos.

Las muestras fueron recogidas en el hospital y se llevaron al laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Medicina Tropical de la UNMSM donde se llevó a cabo el procesamiento de muestras. Las muestras solo fueron aceptadas con cuatro horas como máximo desde que fueron extraídas hasta el inicio de su proceso.

Un tiempo mayor afecta la viabilidad de las células. Por ese motivo de las de 50 muestras recolectadas solo 44 pudieron ser procesadas.

Los controles sanos fueron rotantes y personal del laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Medicina Tropical de la UNMSM, a los cuales se les hizo firmar un pequeño consentimiento informado aceptando la toma de muestra sanguínea y su inclusión en el estudio. Para seguir el mismo esquema utilizado para las muestras de pacientes infectados, las muestras de los controles solo fueron codificadas con códigos numéricos. El proceso que siguieron las muestras fue el mismo que el utilizado para los pacientes infectados. Ya que los controles se encontraban físicamente en el lugar donde se procesaron las muestras no fue necesario descartar ninguna muestra ya que todas cumplían con los criterios de inclusión.

## **2.1.7 PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS**

La identificación de células NKT se llevó a cabo utilizando la técnica de citometría de flujo con cuatro fluorocromos. Se utilizó el reactivo MultiTEST CD3 FITC/CD16 + CD56 PE/CD45 PERCP/CD19 APC de Becton Dickinson (BD) con tubos Trucount (BD) para el recuento absoluto de los subconjuntos celulares.

Se utilizó para la lectura de las muestras el citómetro de flujo BD Accuri™ c6. El análisis de las mismas se realizó utilizando el mismo software del citómetro.

Previo al procesamiento de las muestras se realizó el procedimiento de compensación que se muestra en el ANEXO N°1. El procedimiento realizado, así como el control de calidad diario se muestra en el ANEXO N°1. Los instructivos del reactivo MultiTEST y tubos Trucount se muestran en los anexos N°2 y N°3 respectivamente.

Se realizó una adquisición de 50000 eventos a velocidad de adquisición media. Previamente, se creó una plantilla especial en la cual se incluyeron las adquisiciones de las muestras control así como patológicas. Ambas fueron identificadas utilizando el código de cada una y la fecha en la que se procesó.

El análisis de resultados se llevó a cabo mediante la plantilla creada y se siguió con la estrategia de análisis recomendado por la guía proporcionada por la casa comercial para el análisis de subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo (36). A esta se adicionó la identificación específica de la población CD3+CD56/CD16+CD19-. Los pasos de la estrategia de análisis se muestran en la figura N°1.

### **Análisis estadístico**

Se obtuvieron los recuentos porcentuales y absolutos de leucocitos, linfocitos totales, linfocitos T, linfocitos B, monocitos, neutrófilos, leucocitos NK y células NKT. Todos los recuentos fueron ingresados a una plantilla de Microsoft Excel®. Luego fueron trabajados en el programa STATA 10. Se evaluaron los resultados por separado y para cada población leucocitaria tomando especial importancia a las células NKT. Se obtuvo la media, desviación estándar y coeficiente de variación de cada grupo de resultados.

Para determinar la distribución normal de las variables se utilizó la prueba Shapiro-Wilk. La comparación de ambos grupos (controles sanos y pacientes infectados) se realizó mediante la prueba de t-student. Para esta última se trabajó con un nivel de significancia del 95 % ( $\alpha=0.05$ ) y 57 grados de libertad.

### **2.1.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Las muestras de sangre fueron colectadas en el marco de atención de personas viviendo con VIH que acuden al hospital nacional 2 de mayo. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado el cual custodia el servicio de infectología del hospital. En este estudio se realizó un análisis anónimo de muestras evitando la posibilidad de identificar a los pacientes de los cuales provino cada muestra.

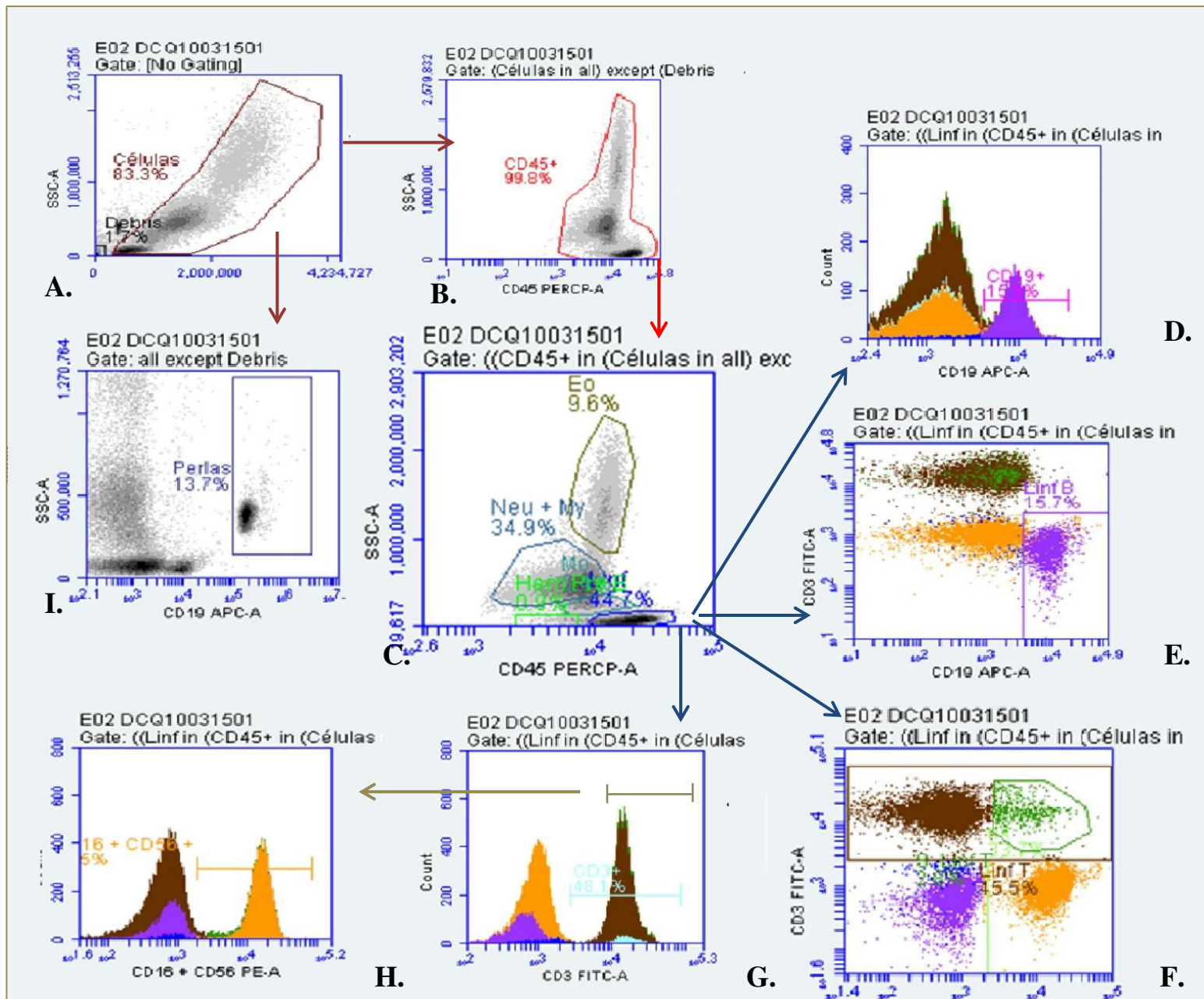
Luego de ser procesadas, las muestras y productos biológicos fueron eliminados siguiendo las normas de bioseguridad. Los datos colectados fueron almacenados solo mediante códigos.

## **CAPÍTULO III**

### **RESULTADOS**

## CAPÍTULO III: RESULTADOS

La estrategia de análisis que se siguió se muestra en la figura N° 1.



**Figura N°1; ESTRATEGIA DE ANÁLISIS:** Se muestra la estrategia de análisis que se utilizó para el análisis de las poblaciones. A partir del gráfico SSC Vs FSC se realizó un gate tratando de encerrar todas las células y otro que abarque el debris caracterizado por FSC y SSC bajo (A). Del gate de células, en el gráfico SSC Vs CD45 se realizó un gate de todos leucocitos caracterizados por ser CD45+, con el objetivo de eliminar el debris restante (B). Del gate de leucocitos y en el mismo gráfico se verificó la posición de las cinco poblaciones leucocitarias (C). Se realizó la diferenciación de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos haciendo un gate de cada uno (C). A partir del gate de linfocitos se determinaron los linfocitos B utilizando el histograma con el marcador CD19 (D) y con el gráfico de puntos enfrentando CD3 Vs CD19 (E). Los datos consignados fueron un promedio de los valores obtenidos a partir de ambos gráficos. A partir del gate de linfocitos se determina el porcentaje de linfocitos T caracterizados por ser CD3+ utilizando el gráfico de tipo histograma con CD3 (G). Del gate de linfocitos CD3 se realizó un histograma con el marcador CD16 + CD56 con el objetivo de identificar las células NKT (CD3+ CD16+CD56+) (H). Con el gate de linfocitos también se realizó un gráfico de puntos enfrentando CD3 Vs CD16 + CD56 (F) con el objetivo de determinar la población de células NK (CD3-CD16+CD56+) y volver a identificar las células NKT, con lo que se hizo un promedio de valores. El recuento de las perlas se realizó en el gráfico de puntos enfrentando SSC Vs. CD19 (I) a partir del gate de células mostrado en el primer grafico (A)



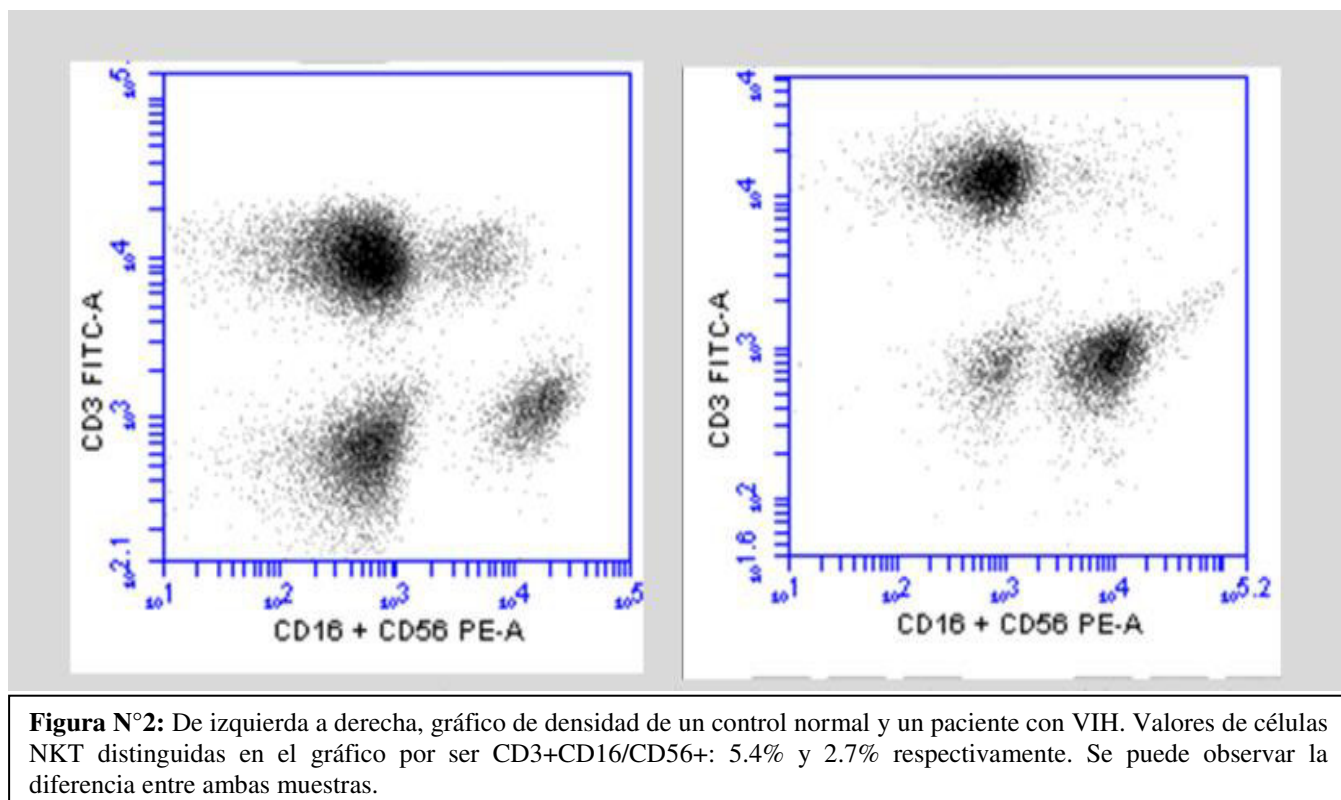
Se obtuvo un total de 50 muestras de pacientes infectados con VIH de las cuales 6 fueron rechazadas por sobrepasar el tiempo apto para el análisis. Se contó con un mayor número de muestras de pacientes infectados con VIH (n=44), las cuales representaron un 74.58% del total (n=59). Se llegaron a trabajar un total de 15 muestras de controles sanos, no se rechazaron muestras de controles. Los datos antes mencionados se muestran en la tabla N°1:

**Tabla N°1: cantidad de participantes obtenidos de cada grupo y valores de principales leucocitos estudiados**

<b>Grupo</b>	<b>Número de muestras (n=59)</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Absoluto leucocitos*</b>	<b>Absoluto linfocitos*</b>	<b>Absoluto NKT*</b>
<b>Control</b>	15	25.42%	3723.87	2846.704	233.03
<b>VIH positivos</b>	44	74.58%	2842.84	1450.012	80.79

\*Células/mm<sup>3</sup>

Solo con los valores de las medias se puede observar la diferencia de valores entre ambos grupos. En la figura N°2 se muestra la diferencia de gráficos de densidad entre una muestra del grupo control y una muestra del grupo con VIH. Se evidencia la disminución de células NKT evidenciadas como CD3+CD56/CD16+ en el gráfico mostrado.



Luego de realizar la prueba de Shapiro-Wilk para todas las variables, se concluyó que los datos tienen distribución normal. A partir de esto se realizó la prueba t-student para comparar las medias de ambos grupos para todas las variables.

**Tabla N°2: Resultados de análisis bivariado para recuento absoluto de células NKT**

Grupo	Media*	95% Intervalo de confianza*	Desviación std	Valor t	Valor p
Control	233.03	167.75 - 298.32	117.90	6.55	<0.00001
VIH positivos	80.79	62.82 - 98.75	59.10		

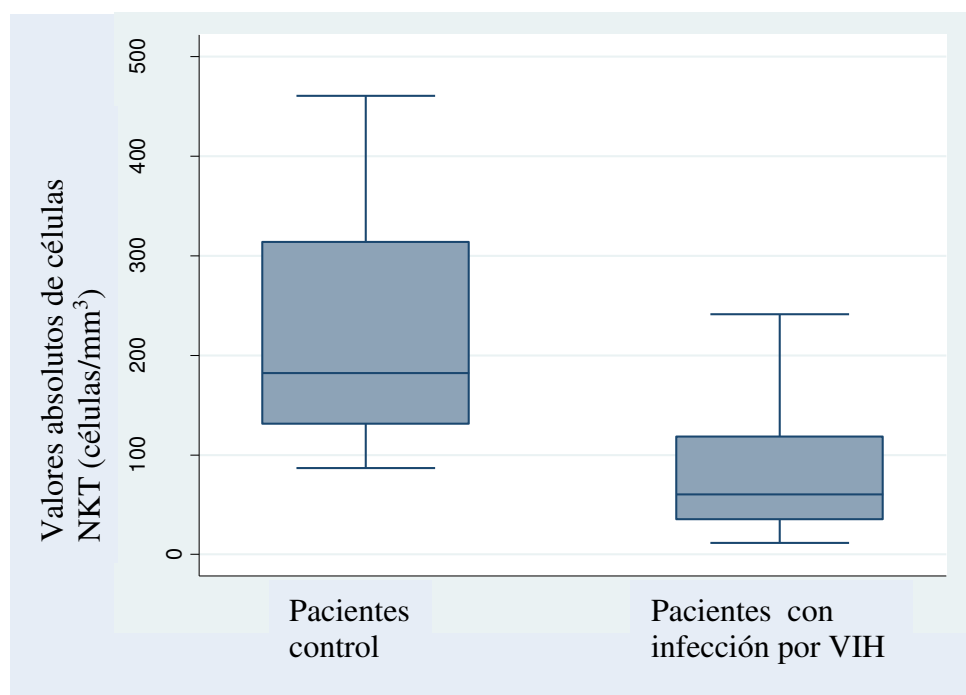
\*Células/mm<sup>3</sup>

En los resultados mostrados en la tabla N° 2 se observa que el recuento absoluto de células NKT es mayor en sujetos sanos con respecto a los recuentos obtenidos a

partir de pacientes infectados con VIH, con medias de 233.03 y 80.79 células/mm<sup>3</sup> respectivamente. Se corrobora una diferencia significativa entre ambas medias a partir del análisis bivariado ( $p < 0.00001$ ).

Se presenta a continuación el grafico de cajas comparando los datos antes mencionados.

**Gráfico N°1: Gráfica de cajas que muestra los valores absoluto de células NKT en el grupo control y el grupo con infección por VIH.**



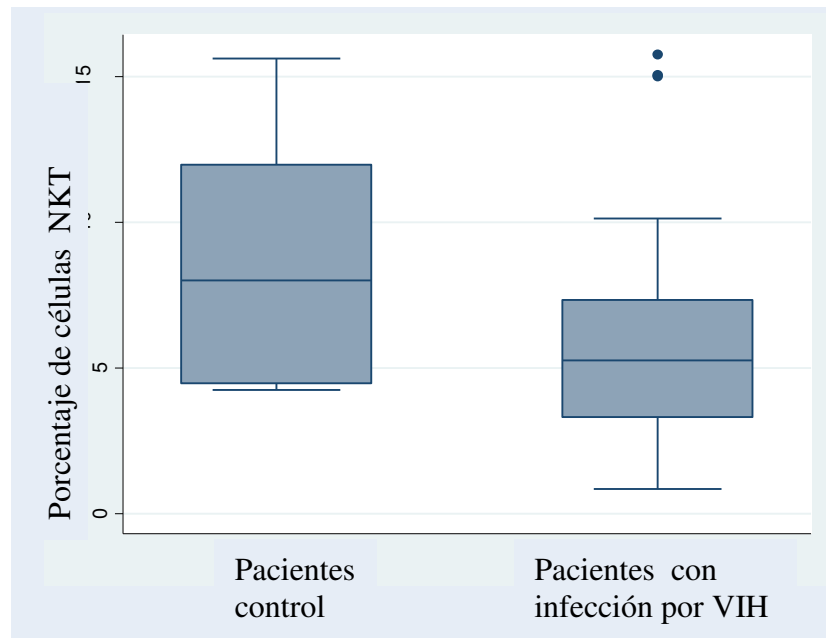
Al igual que lo observado con el recuento absoluto, las diferencias de las medias de los valores porcentuales de células NKT con respecto a linfocitos (8.65% grupo control y 5.99% grupo con VIH) y leucocitos (3.27% grupo control y 1.65% grupo con VIH) es significativo cuando se compara ambos grupos ( $p = 0.0168$  y  $p = 0.0001$  respectivamente) (cuadro N°3).

**Tabla N°3: Resultados de análisis bivariado para cada grupo de leucocitos**

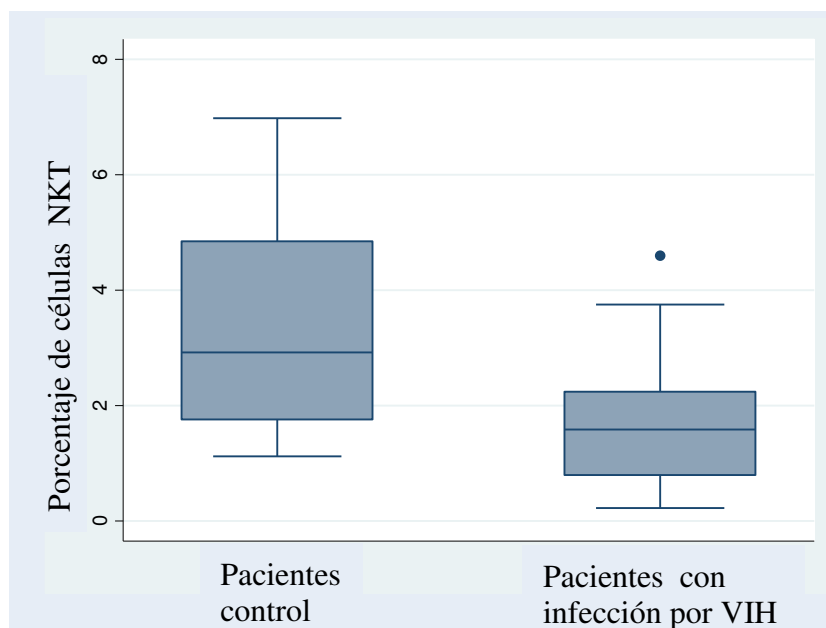
		Grupo	Media	Desviación Std	95 % intervalo de confianza	Valor t	Valor p
<b>NKT</b>	% de linfocitos	Control	8.65	4.05	6.40 - 10.89	2.46	0.0168
		VIH	5.99	3.45	4.95 - 7.04		
	% del total de leucocitos	Control	3.27	1.87	2.23 - 4.31	4.28	0.0001
		VIH	1.65	0.99	1.35 - 1.95		
	Absoluto*	Control	233.03	117.9	167.75 - 298.32	6.55	<0.0000
		VIH	80.79	59.1	62.82 - 98.75		
<b>NK</b>	% de linfocitos	Control	11.11	6.24	7.65 - 14.57	-1.83	0.0718
		VIH	16.03	9.69	13.09 - 18.98		
	% del total de leucocitos	Control	4.31	3.01	2.64 - 5.98	-0.06	0.9537
		VIH	4.36	2.97	3.46 - 5.26		
	Absoluto*	Control	316.61	208.63	201.17 - 432.25	2.09	0.0414
		VIH	208.33	160.76	159.45 - 257.20		
<b>CD3</b>	% de linfocitos	Control	68.70	5.51	65.65 - 71.76	-1.61	0.1128
		VIH	73.82	11.82	70.23 - 77.42		
	% del total de leucocitos	Control	25.61	6.74	21.87 - 29.34	1.51	0.1359
		VIH	21.44	9.89	18.43 - 24.44		
	Absoluto*	Control	1963.90	551.63	1658.42 - 2269.38	3.62	0.0006
		VIH	1103.06	860.22	841.53 - 1364.59		
<b>CD19</b>	% de linfocitos	Control	17.54	5.98	14.23 - 20.86	7.90	<0.0000
		VIH	6.15	4.38	4.82 - 7.48		
	% del total de leucocitos	Control	6.41	2.54	5.00 - 7.82	9.07	<0.0000
		VIH	1.74	1.35	1.33 - 2.15		
	Absoluto*	Control	492.48	207.10	377.29 - 607.66	8.99	<0.0000
		VIH	96.19	121.29	59.31 - 133.06		
<b>Linfocitos</b>	% del total de leucocitos	Control	37.24	9.18	32.16 - 42.32	2.91	0.0052
		VIH	28.43	10.43	25.26 - 31.60		
	Absoluto*	Control	2846.70	722.52	2446.59 - 3246.82	4.71	<0.0000
		VIH	1450.01	1065.44	1126.09 - 1773.94		
<b>Leucocitos</b>	Absoluto*	Control	3723.87	917.72	3215.65 - 4232.09	2.91	0.0026
		VIH	2842.84	1042.95	2525.75 - 3159.93		

**NKT:** Células NKT; **NK:** Células Natural killer (asesinas naturales); **CD3:** Linfocitos CD3 positivos (linfocitos T); **CD19:** Linfocitos CD19 positivos (linfocitos B); **% de linfocitos:** Porcentaje de células respecto al recuento total de linfocitos; **% del total de leucocitos:** Porcentaje de células respecto al recuento total de leucocitos; **Absoluto:** recuento absoluto (\*Células/mm<sup>3</sup>)

**Gráfico N°2: Gráfica de cajas que muestra los valores porcentuales de células NKT con respecto a los linfocitos totales en el grupo control y el grupo con infección por VIH.**

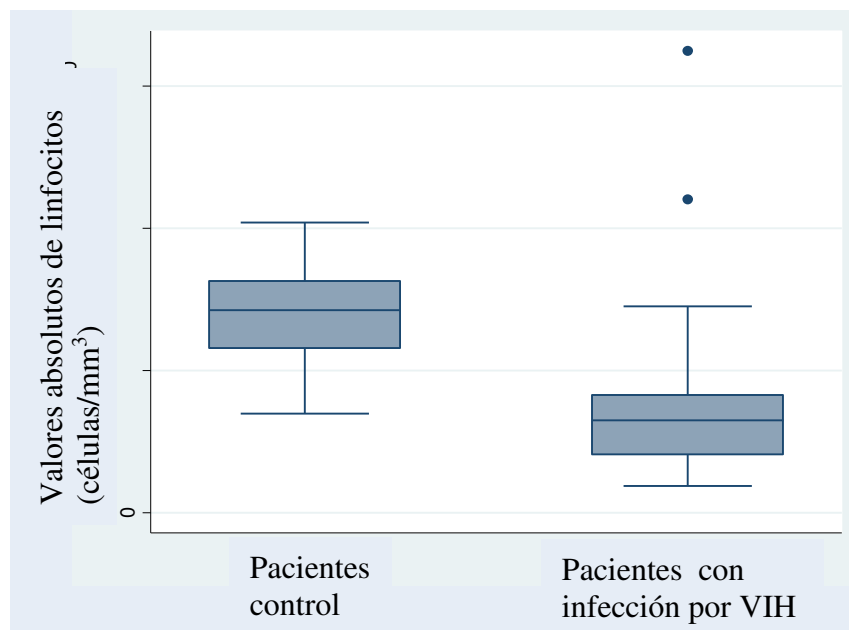


**Gráfico N°3: gráfica de cajas que muestra los valores porcentuales de células NKT con respecto a leucocitos totales en el grupo control y el grupo con infección por VIH.**



Los valores absolutos y porcentuales de linfocitos se ven disminuidos en el grupo de pacientes infectados en comparación con el grupo control. La media de los valores absolutos fueron 2846.70 y 1450.01 células/mm<sup>3</sup> respectivamente. La diferencia de ambos grupos se verifica con el p tan bajo que se obtuvo para ambos valores ( $p=0.0052$  para valores porcentuales y  $<0.0000$  para absolutos).

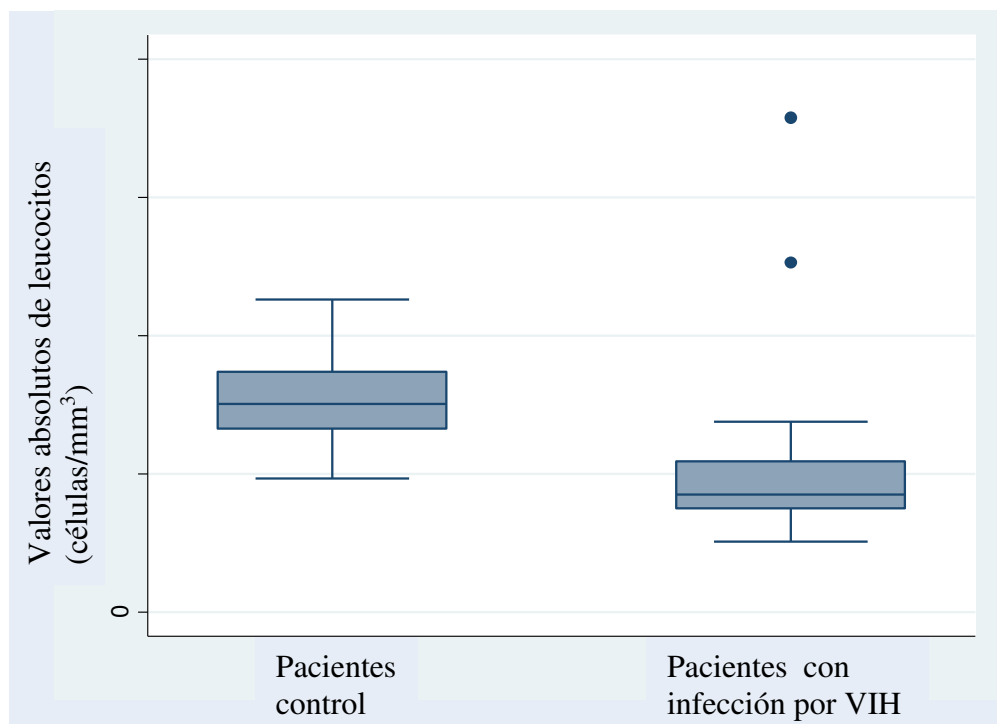
**Gráfico N°4: gráfica de cajas que muestra los valores absolutos de linfocitos con respecto a leucocitos totales en el grupo control y el grupo con infección por VIH.**



En lo que respecta a los subconjuntos de linfocitos, los valores porcentuales de linfocitos CD3 no variaron entre ambos grupos pero si hubo diferencia en el valor absoluto de estas células. En cambio los valores porcentuales y absolutos de linfocitos CD19 si mostraron diferencias.

Los valores absolutos de leucocitos se ven visiblemente disminuidos en el grupo con VIH con una media de 2842.84 en comparación con las 3723.87 células que se observa como media en el grupo control. Esta diferencia es significativa con un valor p de 0.0026.

**Gráfico N° 5: gráfica de cajas que muestra los valores absolutos de leucocitos totales en el grupo control y el grupo con infección por VIH.**



## **CAPÍTULO IV**

### **DISCUSIÓN**



## **CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN**

Al igual que en estudios realizados en países fuera de Sudamérica, como Estados Unidos (23), Australia (22) y Países bajos (26), se quiso determinar si es que las células NKT disminuyen en pacientes infectados con VIH. El análisis estadístico realizado en el presente trabajo corrobora lo antes expuesto, demostrando que hay una diferencia significativa entre las medias de los valores absolutos de un grupo de pacientes infectado con VIH y un grupo control.

La disminución de células NKT ya había sido descrita en poblaciones fuera del país y de la región (9, 20). Por lo tanto, al ser el primer estudio que trabaja con población peruana, se deduce que la disminución selectiva de células NKT es un proceso inevitable en todos los pacientes infectados con este retrovirus, el cual se evidencia desde los inicios de la infección.

Las razones para explicar la disminución selectiva son variadas entre las que se discuten la infección preferencial, secuestro en órganos linfoides y muerte celular inducida por activación.

La importancia de las células NKT se observa en la infección por VIH, lo cual ha quedado evidenciado tanto en estudios con modelos animales (21), cultivos in vitro (23) y estudios poblacionales (20). En células dendríticas infectadas con VIH, aumenta la expresión de CD1d y la presentación de antígenos propios, lo cual es dependiente de TLR-7. Se ha observado que las proteínas Vpu y Nef disminuyen la expresión de la molécula CD1d, e interfieren con la carga de antígenos lipídicos propios a esta, esto funciona como un mecanismo de evasión. Se considera que este mecanismo tendría importancia en las primeras fases de la infección, ya que estas células se encuentran en el órgano sexual femenino siendo este uno de los puntos de entrada del virus (37). Se sugiere además que las NKT juegan un rol en el establecimiento de la infección debido a su permanente estado activado (25).

Según lo observado en los estudios de Fernández y cols (22), esta disminución podría verse acompañada de una función anormal de las células NKT, viéndose disminuida su producción de interferón gamma.

Adicionalmente a lo antes expuesto, estas células también podrían impedir que el individuo infectado adquiera infecciones oportunistas, por ejemplo, se ha observado que en pacientes con *Mycobacterium tuberculosis*, el cual es una de las principales infecciones oportunistas en individuos infectados con VIH (38) y en nuestro país llegó a una comorbilidad de 3.2% en el año 2012 (2), la cantidad y función de las células NKT se encuentran disminuidas en pacientes con tuberculosis respiratoria o tuberculosis extrapulmonar, mas no en infección latente ni en controles sanos (39). Del mismo modo la activación por parte de la molécula  $\alpha$ -galactosilceramida se encuentra inhibida en los dos primeros grupos (39). Se necesitan estudios que correlacionen la importancia que tienen las células NKT en el mantenimiento del paciente con infección por VIH y la importancia de estas células para evitar aparición de infecciones oportunistas en estos pacientes.

Otra información que sería interesante contrastar es la calidad, ya sea en número y función de estas células en individuos propensos a contraer la infección de VIH para observar si es que tener un número por debajo de lo normal o una función alterada es un factor de riesgo para contraer la infección. A pesar que el estudio realizado por Córdor, José y colaboradores, donde se establecen intervalos de referencia de subpoblaciones linfocitarias en Lima, Perú (40) no hay información disponible de los intervalos de referencia de células NKT en nuestro país. Los datos que brinda el estudio mencionado indican que las medias de los valores absolutos y porcentuales de linfocitos T (CD3+) y células NK tanto de los pacientes con VIH y de los controles obtenidos en este trabajo se encuentran dentro de sus intervalos de referencia. Lo que no ocurre con los valores absolutos de linfocitos B (CD19+) donde la media del recuento absoluto en pacientes con VIH se encuentra por debajo del límite inferior del intervalo de referencia propuesto por Córdor, José y colaboradores. Esto podría indicar que la disminución de algunas células en individuos infectados con VIH, como los linfocitos T podría no observarse cuando se compara con valores normales establecidos, pero si se evidencia una diferencia significativa cuando se comparan medias del grupo infectado y el grupo control, situación que no ocurre con otros subconjuntos de linfocitos como los linfocitos B donde la variación de valores es mayor y puede ser observada cuando se comparan con intervalos normales establecidos previamente. Respecto a los intervalos de

referencia de células NKT, los únicos datos disponibles de la región son los encontrados por Rojas-Panales y cols en donantes de sangre de la ciudad de Bogotá (Colombia)(33), donde los porcentajes de células NKT respecto a los linfocitos en hombres y mujeres fueron de 3.5% (+/- 2.9) y 3% (+/-2.5) respectivamente y sus valores absolutos fueron 95.5 / mm<sup>3</sup> (+/- 77) para hombres y para mujeres 70.1 /mm<sup>3</sup> (+/-47.7). Como se puede observar en los resultados (tabla N°3), los valores porcentuales al igual que los absolutos de los controles normales son diferentes en mi estudio, siendo mayores en comparación con la investigación mencionada.

Como es de esperarse en este tipo de infección, el recuento absoluto de leucocitos, linfocitos totales, así como los CD3 se encuentran visiblemente disminuidos. Situación que no ocurre con las células NK, donde no se encuentra significancia estadística entre ambos grupos. Situación que va en concordancia con la bibliografía existente donde lo que se modifica en este grupo celular son los subconjuntos fenotípicos y que no son objetivo de esta investigación (41).

Se demuestra una vez más la disminución de estas células, lo que según los estudios previos realizados en otros países tendría consecuencias directas en el mantenimiento del paciente infectado con VIH. Mantenerlas durante el curso de la infección podría prolongar la fase crónica de la infección, del mismo modo pueden ser utilizadas como coadyuvantes en vacunas futuras. Se requieren futuros estudios y se espera que este sea el inicio de trabajos que se realicen en el país respecto a inmunidad innata y VIH.

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## **CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **4.1 CONCLUSIONES**

- Según el presente estudio se puede concluir que los valores de células NKT tanto porcentuales como absolutos se ven disminuidos en pacientes recientemente infectados con VIH en comparación con individuos sanos.
- La disminución de células NKT podría favorecer la adquisición de infecciones oportunistas y tumores en pacientes con infección por VIH.
- Los linfocitos totales, al igual que los linfocitos CD3 y CD19 se ven disminuidos en pacientes con infección reciente por VIH.
- No hay diferencia significativa en lo que respecta a las células NK entre pacientes recientemente diagnosticados con VIH y un el grupo control.

### **4.2 RECOMENDACIONES**

- Sería recomendable determinar el estadio de la infección, carga viral y cantidad de linfocitos T CD4, conjuntamente con los valores de células NKT, en pacientes recientemente diagnosticados con VIH.
- Se deberían evaluar los subconjuntos de células NKT (NKT I y NKT II) en pacientes con infección por VIH.
- Sería productivo medir expresión de citocinas para no evaluar solo cantidad de células, sino también función de estas.
- A pesar que hay datos disponibles sobre valores normales en la región de Sudamérica, es necesario establecer nuestros propios valores para células NKT y los demás subconjuntos leucocitarios para su uso en futuros estudios y en la práctica clínica en general.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Montagnier L. 25 years after HIV discovery: prospects for cure and vaccine. *Virology*. 2010;397(2):248-54.
2. Ministerio de Salud del Perú. Análisis de la situación epidemiológica del VIH/SIDA en el Perú. 2013.
3. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita*. 2010;46(1):5-14.
4. Sundquist WI, Kräusslich HG. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(7):a006924.
5. Swanstrom R, Coffin J. HIV-1 pathogenesis: the virus. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(12):a007443.
6. Montoya C, Moreno M, Rugeles M. Reacciones y alteraciones del sistema inmune durante la infección por el VIH-1. *Asociación colombiana de infectología*. 2006;10(4):250-65.
7. Borrow P, Shattock RJ, Vyakarnam A, Group EW. Innate immunity against HIV: a priority target for HIV prevention research. *Retrovirology*. 2010;7:84.
8. Erazo L, Alvarez J, Trujillo C. Linfocitos NKT invariantes: ontogenia, fenotipo y función. *Inmunología*. 2014;33(2):51-9.
9. Li D, Xu XN. NKT cells in HIV-1 infection. *Cell Res*. 2008;18(8):817-22.
10. Román A, Rugeles M, Montoya C. Papel de células NKT invariantes en la respuesta inmune anti-viral. *Colombia médica*. 2006;37(2):159-68.
11. Berzins SP, Ritchie DS. Natural killer T cells: drivers or passengers in preventing human disease? *Nat Rev Immunol*. 2014;14(9):640-6.

12. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol*. 2004;4(3):231-7.
13. Shin JH, Park SH. The effect of intracellular trafficking of CD1d on the formation of TCR repertoire of NKT cells. *BMB Rep*. 2014;47(5):241-8.
14. Diana J, Lehuen A. NKT cells: friend or foe during viral infections? *Eur J Immunol*. 2009;39(12):3283-91.
15. Kumar V, Delovitch TL. Different subsets of natural killer T cells may vary in their roles in health and disease. *Immunology*. 2014;142(3):321-36.
16. Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol*. 2009;129(7):1628-42.
17. Vasan S, Tsuji M. A double-edged sword: the role of NKT cells in malaria and HIV infection and immunity. *Semin Immunol*. 2010;22(2):87-96.
18. Wu L, Van Kaer L. Natural killer T cells in health and disease. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011;3:236-51.
19. Littwitz-Salomon E, Schimmer S, Dittmer U. Natural killer T cells contribute to the control of acute retroviral infection. *Retrovirology*. 2017;14(1):5.
20. Sandberg JK, Fast NM, Palacios EH, Fennelly G, Dobroszycki J, Palumbo P, et al. Selective loss of innate CD4(+) V alpha 24 natural killer T cells in human immunodeficiency virus infection. *J Virol*. 2002;76(15):7528-34.
21. Fernandez CS, Chan AC, Kyparissoudis K, De Rose R, Godfrey DI, Kent SJ. Peripheral NKT cells in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Virol*. 2009;83(4):1617-24.
22. Fernandez CS, Kelleher AD, Finlayson R, Godfrey DI, Kent SJ. NKT cell depletion in humans during early HIV infection. *Immunol Cell Biol*. 2014;92(7):578-90.

23. Motsinger A, Haas DW, Stanic AK, Van Kaer L, Joyce S, Unutmaz D. CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med*. 2002;195(7):869-79.
24. Motsinger A, Azimzadeh A, Stanic AK, Johnson RP, Van Kaer L, Joyce S, et al. Identification and simian immunodeficiency virus infection of CD1d-restricted macaque natural killer T cells. *J Virol*. 2003;77(14):8153-8.
25. Fleuridor R, Wilson B, Hou R, Landay A, Kessler H, Al-Harthi L. CD1d-restricted natural killer T cells are potent targets for human immunodeficiency virus infection. *Immunology*. 2003;108(1):3-9.
26. van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Hazenberg MD, Nishi N, Otto SA, van Benthem BH, et al. Selective decrease in circulating V alpha 24+V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection. *J Immunol*. 2002;168(3):1490-5.
27. WHO. [Base de datos de internet]. Lugar: Global summary of the AIDS epidemic 2015; 2015. [Consultado el 16 de marzo del 2017]. WHOepicore.[1 página]. DISPONIBLE EN: [http://www.who.int/hiv/data/epi\\_core\\_2016.png?ua=1](http://www.who.int/hiv/data/epi_core_2016.png?ua=1).
28. Ministerio de Salud del Perú. Situación del VIH/SIDA en el Perú. Boletín Epidemiológico Mensual. DICIEMBRE 2016 [Internet]. Centro nacional de Epidemiología, Prevención y Control de enfermedades. 2016. [acceso el 15 de marzo del 2017]. DISPONIBLE EN: [http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/vih/Boletin\\_2016/diciembre.pdf](http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/vih/Boletin_2016/diciembre.pdf)
29. Subrahmanyam P, Webb TJ. Boosting the Immune Response: The Use of iNKT cell ligands as vaccine adjuvants. *Front Biol (Beijing)*. 2012;7(5):436-44.
30. Crowe NY, Godfrey DI, Baxter AG. Natural killer T cells are targets for human immunodeficiency virus infection. *Immunology*. 2003;108(1):1-2.
31. Sharma AA, Chew L, Ladd M, Jen R, Lavoie PM. Ex vivo purification and characterization of human invariant Natural Killer T cells. *J Immunol Methods*. 2011;373(1-2):1-7.



32. Metelitsa LS. Flow cytometry for natural killer T cells: multi-parameter methods for multifunctional cells. *Clin Immunol.* 2004;110(3):267-76.
33. Rojas P, Bolaños N, Mercado M, Gonzales J, Cuellar A, Cifuentes R. Valores de referencia de células asesinas naturales (NK y NKT) en donantes de sangre de Bogotá. *Acta médica colombiana.* 2007;32(3):124-8.
34. Jiang Y, Cui X, Cui C, Zhang J, Zhou F, Zhang Z, et al. The function of CD3+CD56+ NKT-like cells in HIV-infected individuals. *Biomed Res Int.* 2014;2014:863625.
35. Vasan S, Poles MA, Horowitz A, Siladji EE, Markowitz M, Tsuji M. Function of NKT cells, potential anti-HIV effector cells, are improved by beginning HAART during acute HIV-1 infection. *Int Immunol.* 2007;19(8):943-51.
36. Biosciences BD. Identification of Human Peripheral Blood Cell Populations with the BD Accuri™ C6 Flow Cytometer 2012.
37. Paquin-Proulx D, Santos BA, Carvalho KI, Toledo-Barros M, Oliveira AK, Kokron CM, et al. Invariant natural killer T cells in patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(4):989-90.
38. Mendoza Ticona A, Iglesias Quilca D. Tuberculosis en pacientes con VIH/SIDA. *Acta Medica Peruana.* 2008;25(4):247-54.
39. Kee SJ, Kwon YS, Park YW, Cho YN, Lee SJ, Kim TJ, et al. Dysfunction of natural killer T cells in patients with active *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun.* 2012;80(6):2100-8.
40. Cóndor JM, Álvarez M, Cano L, Matos E, Leiva C, Paredes JA. [Reference intervals for peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults in Lima, Peru]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2013;30(2):235-40.
41. Mantegani P, Tambussi G, Galli L, Din CT, Lazzarin A, Fortis C. Perturbation of the natural killer cell compartment during primary human

immunodeficiency virus 1 infection primarily involving the CD56 bright subset.  
Immunology. 2010;129(2):220-33.

## **ANEXOS**

## **ANEXOS**

### **Anexo N°1: Procedimiento de compensación, control de calidad y procesamiento de muestras**

#### ***Compensación***

Previo al inicio del proceso de muestras tuvo que ser realizada la compensación del instrumento.

El procedimiento se llevó a cabo con una muestra de sangre total obtenida a partir de un control sano. Debido a la falta de marcadores individuales para cada color, se realizó una estrategia de ubicación esperada en cada gráfico de adquisición procesando la muestra por duplicado, una en un tubo con fluorocromo y otra sin marcadores. El procedimiento que se realizó fue el siguiente:

- La muestra fue procesada por duplicado siguiendo el mismo protocolo de trabajo utilizado para las demás muestras
- El primer tubo fue marcado con los fluorocromos utilizados en el estudio, el segundo tubo se procesó sin fluorocromos.
- Ambos tubos siguieron el mismo procedimiento de lisado.
- Una vez finalizado el proceso de la muestra se adquirió primero el tubo que no posee fluorocromos, los resultados de esta adquisición sirvieron para establecer los puntos de corte negativos.
- Sobre los datos adquiridos del control negativo se adquirió el tubo marcado con los anticuerpos monoclonales.

- Los datos fueron comparados basándose en la población de linfocitos, la ubicación de los controles de cada población y considerando la referencia negativa.
- Se realizaron los ajustes necesarios de cada población hasta corregir los valores de solapamiento.
- Estos valores fueron utilizados para todas las muestras.

#### ***Control de calidad del citómetro***

Diariamente se realizó el control de calidad del instrumento el cual evalúa la precisión del método. Este procediendo se llevó a cabo mediante la utilización de perlas provistas por el fabricante que poseen un tamaño, complejidad, intensidad de fluorescencia y cantidad de perlas definidas por frasco. Se utilizaron perlas de seis y ocho picos.

A partir de la adquisición de las perlas se evaluó la cantidad de picos de cada una en un gráfico definido, así como el coeficiente de variación del pico más brillante de un gráfico determinado.

Para poder hacer un seguimiento del performance de cada día de procesamiento se utilizó el mismo archivo del Software BD Accuri C6 cada día que se procesó una muestra.

El procedimiento diario siguió como se describe a continuación:

- Las perlas de 8 picos se prepararon colocando en un tubo de 12x75mm 500 uL de agua destilada y una gota del reactivo provisto por el fabricante para luego mezclar utilizando el vórtex. Las perlas de 6 picos se prepararon colocando en un tubo una gota de cada vial en 500 uL de agua destilada.

- Antes de adquirir los controles se realizó un lavado con agua destilada a velocidad alta durante dos minutos.
- Se seleccionó la casilla correspondiente al día de procesamiento en la plantilla de controles, se identificó cada casilla con el día de la corrida y el tipo de perlas que se adquirieron en esa casilla.
- Se adquirió hasta 50000 eventos a velocidad lenta.
- Luego de la adquisición se sacó el tubo del SIP (sample injection port, puerto de entrada de la muestra) y se realizó un procedimiento de lavado rápido sobre un tubo con agua destilada, este está indicado como flush en el software.
- El lavado con agua destilada se realizó hasta que el número de eventos adquiridos a partir de un tubo nuevo con agua destilada fue mínimo.
- El performance se evaluó a partir de las adquisiciones realizadas.
- Si se cumplieron los requisitos necesarios para cada perla mencionados antes se procedió adquirir las muestras.

La exactitud del método se evaluó corriendo una muestra de un control sano diariamente. En esta se observó la presencia de linfocitos, posición y complejidad en el gráfico SSCvsCD45. En este mismo gráfico se observó la separación de las poblaciones de granulocitos y monocitos.

### ***Protocolo de trabajo***

El protocolo se realizó como indica el fabricante, que incluye los siguientes pasos:

- Previo al procesamiento se preparó la solución lisante diluyendo 1 parte de solución 10x en 9 partes de agua destilada (5 mL de sol. 10x en 45 mL de H<sub>2</sub>O destilada)

- Los tubos Trucount fueron rotulados según corresponda, por cada muestra fue utilizado un tubo Trucount. La viabilidad del tubo se verificó observando la presencia de una perla en el fondo del tubo.
- Se agregó al fondo del tubo, por encima de la rejilla de acero, 20 uL de reactivo Multitest.
- Luego de haber mezclado las muestras 20 veces por inversión, se agregaron 50 uL con el método de pipeteo inverso.
- Se taparon y agitaron los tubos con ayuda del vórtex para mezclar bien el reactivo y la muestra.
- Los tubos se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Pasado el tiempo se agregaron 450 uL de solución lisante 1X. Se taparon y agitaron los tubos en el vórtex. Se volvió a incubar por 15 minutos a oscuridad y temperatura ambiente.
- Al término de la incubación la muestra ya podía ser adquirida, antes de cada lectura se realizó una suave agitación con el vórtex.

## 1. USO PROPUESTO

### BD Multitest

#### CD3 FITC/CD16 + CD56 PE/ CD45 PerCP/CD19 APC Reactivo

50 pruebas por vial – No. de catálogo 342416

50 pruebas por vial con tubos TruCOUNT –

No. de catálogo 342446

Para la determinación de porcentajes y recuentos absolutos de linfocitos humanos T, asesinos naturales y B en sangre entera con los eritrocitos lisados

6/2010

23-5349-01



BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2010 BD



#### Becton, Dickinson and Company BD Biosciences

San Jose, CA 95131

Tel (877) 232 8995

Fax (408) 954 2347

ClinicalApplications@bd.com



#### BENEX Limited

Rineanna House

Shannon Free Zone

Shannon, County Clare

Irlanda

Tel (353) 61 472920

Fax (353) 61 472907

#### BD Biosciences

Asistencia de Cliente al europea

Tel (32) 2 400 9895

Fax (32) 2 401 7094

help.biosciences@europea.bd.com

bdbiosciences.com

El MultiTEST™ CD3 conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC)/CD16 + CD56<sup>+</sup> conjugado a ficoeritrina<sup>†</sup> (PE)/CD45 conjugado a la proteína peridín clorofila<sup>‡</sup> (PerCP)/CD19 conjugado a alofocianina<sup>†</sup> (APC) de BD es un reactivo para inmunofluorescencia directa de cuatro colores para usarse en un citómetro de flujo debidamente equipado para la identificación y determinación de los porcentajes y recuentos absolutos de linfocitos humanos T maduros (CD3<sup>+</sup>), asesinos naturales (NK) (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) y B (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) en sangre entera con los eritrocitos lisados. Cuando se utiliza con los tubos TruCOUNT™, los recuentos absolutos de estas poblaciones se pueden enumerar en un solo tubo.

Los reactivos BD MultiTEST y los tubos TruCOUNT se pueden usar con el cargador automático FACS Loader.

## 2. RESUMEN Y EXPLICACION

Los linfocitos humanos pueden clasificarse en tres principales poblaciones según su función biológica y su expresión de antígenos de superficie celular: linfocitos T, linfocitos B y linfocitos asesinos (NK).

### Aplicaciones clínicas

Se ha demostrado que los linfocitos asesinos naturales (NK), identificados como CD3<sup>-</sup> y CD16<sup>+</sup> y/o CD56<sup>+</sup>, sirven de mediadores en la citotoxicidad contra ciertos tumores y células infectadas por virus<sup>1</sup>. La citotoxicidad mediada por los NK no requiere la presencia de moléculas de clase I ni de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en las células blanco<sup>2</sup>.

\* Patente de EE.UU. No. 4.895.796

† Patente de EE.UU. No. 4.520.110; patente europea No. 76.695; y patente canadiense No. 1.179.942

‡ Patente de EE.UU. No. 4.876.190



Los linfocitos totales T y B se usan para caracterizar y hacer el seguimiento de ciertas inmunodeficiencias<sup>3-5</sup> y enfermedades autoinmunes<sup>6,7</sup>.

### 3. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Cuando se añade sangre entera al reactivo, los anticuerpos marcados con fluorocromos del reactivo se unen en forma específica a los antígenos de superficie de los leucocitos. Durante la adquisición, las células pasan a través del haz de láser y dispersan la luz láser. Las células teñidas fluorescen. Estas señales de dispersión de la luz y de fluorescencia son detectadas por el instrumento y dan información sobre el tamaño de la célula, la complejidad interna y la intensidad relativa de la fluorescencia. Los reactivos MultiTEST utilizan la fluorescencia para seleccionar la población, lo que permite establecer ventanas de fluorescencia directamente para la población de linfocitos<sup>8-10</sup> y reducir así en la ventana la contaminación con glóbulos rojos de la sangre nucleados o sin lisar.

Cuando se usan tubos TruCOUNT, se tiñe un volumen conocido de la muestra directamente en el tubo. El sedimento liofilizado del tubo se disuelve, liberando un número conocido de microesferas fluorescentes. Durante el análisis, el número absoluto (células/ $\mu$ L) de células positivas en la muestra se puede determinar al comparar los eventos celulares con los eventos de microesferas. Si se emplea un software adecuado como MultiSET™, el software calculará los recuentos absolutos. Si el análisis de los datos va a ser manual cuando se usa un software como el CellQuest™, simplemente divida el número de eventos celulares positivos entre el número de eventos de microesferas, y multiplique el resultado por la concentración de microesferas en el tubo TruCOUNT.

### 4. REACTIVO

#### **Reactivo suministrado, suficiente para 50 pruebas**

El reactivo MultiTEST CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 de BD se suministra en 1 mL de solución salina tamponada que contiene azida de sodio al 0,1%. Contiene Ac anti-CD3 marcado con FITC, clon SK7; Ac anti-CD16, clon B73.1<sup>14-16</sup> y Ac anti-CD56, clon NCAM 16.2<sup>17</sup> marcados con PE; Ac anti-CD45 marcado con PerCP, clon 2D1 (HLE-1)<sup>18</sup> y Ac anti-CD19 marcado con APC, clon SJ25C1<sup>19</sup>.

CD3 identifica los linfocitos T y reconoce la cadena epsilon del complejo antígeno CD3/receptor del antígeno de la célula T (TCR)<sup>20</sup>. Este complejo está formado por lo menos por seis proteínas con un peso molecular que varía entre 20 y 30 kilodaltones (kDa)<sup>21</sup>. El antígeno reconocido por los anticuerpos anti-CD3 está asociado en forma no covalente con el TCR  $\alpha/\beta$  o  $\gamma/\delta$  (70 a 90 kDa)<sup>22</sup>.

CD16 conjuntamente con CD56 facilitan la identificación de la población de linfocitos NK<sup>1,9</sup>. CD16 reconoce un antígeno de 50 a 70 kDa de los linfocitos NK humanos que es un receptor Fc para IgG<sup>14,15,23</sup>. El antígeno CD16 reacciona en forma variable con los granulocitos<sup>15</sup>. CD56 reconoce un dominio extracelular similar a las inmunoglobulinas que es común para tres formas de peso molecular (Mr 120, 140 y 180 kDa) de la molécula de adhesión de las células neurales (NCAM)<sup>24-26</sup>.

El Ac monoclonal anti-CD45 identifica los leucocitos y reconoce un antígeno de leucocito humano de 180 a 220 kDa, que es miembro de la familia de los antígenos comunes de los leucocitos (LCA)<sup>27</sup>.

El Ac monoclonal anti-CD19 identifica los linfocitos B y reconoce un antígeno de 90 kDa que está presente en todas las fases de maduración de los linfocitos humanos B pero que se pierde en las células plasmáticas<sup>28</sup>. Es

posible que el antígeno CD19 participe en la activación y proliferación de los linfocitos B<sup>28</sup>.

Los anticuerpos anti-CD3, anti-CD16, anti-CD45 y anti-CD19 están compuestos de cadenas pesadas  $\gamma_1$  y cadenas ligeras kappa de ratón. El anticuerpo anti-CD56 está compuesto de cadenas pesadas  $\gamma_{2b}$  y cadenas ligeras kappa de ratón.

Los tubos TruCOUNT contienen un sedimento secado por congelación de microesferas fluorescentes en un tubo de un solo uso. Cada bolsita TruCOUNT contiene 25 tubos, suficientes para 25 pruebas.

### Precauciones

1. Para uso diagnóstico in vitro.
2. El reactivo no se debe usar si se nota cualquier cambio en el aspecto. La precipitación o cambio de color indican inestabilidad o deterioro.
3. Los reactivos de anticuerpos contienen azida de sodio como agente conservante. Sin embargo, se debe tener cuidado de evitar la contaminación bacteriana ya que puede producir resultados erróneos.

**ADVERTENCIA:** La azida de sodio es dañina si se ingiere (R22). Se debe mantener fuera del alcance de los niños (S2). Se debe mantener alejada de los alimentos, las bebidas y los alimentos para animales (S13). Se debe usar ropa protectora adecuada (S36). En caso de ingestión, solicitar de inmediato atención médica y mostrar este recipiente o esta etiqueta (S46). Al entrar en contacto con ácidos libera un gas sumamente tóxico (R32). Los compuestos de azida deben desecharse con grandes cantidades de agua para evitar que se formen acumulaciones en las cañerías de plomo o cobre donde podrían darse las condiciones para una explosión.

4. **ADVERTENCIA:** Se consideran riesgos biológicos todos los especímenes y los materiales con los cuales han estado en contacto. Maneje todos los especímenes biológicos y los materiales como si fueran capaces de transmitir infecciones<sup>29,30</sup> y deséchelos tomando las precauciones adecuadas de acuerdo con los reglamentos federales, estatales y locales. Nunca se debe aspirar la pipeta con la boca. Se debe usar ropa y guantes de protección apropiados. Se ha informado que la fijación inactiva el VIH<sup>31</sup>.
5. Se requiere la solución lisante FACS™\* que contiene dietilenglicol y formaldehído. Para ver las advertencias, se puede consultar el folleto de instrucciones de la *solución lisante FACS*.
6. Para obtener los resultados, si se usan tubos TruCOUNT, es crítico que el volumen de sangre que se agregue sea exacto. Las pipetas deben estar calibradas para dispensar exactamente 50  $\mu$ L de la muestra. Se puede obtener de BD una pipeta electrónica que opera en la modalidad inversa (ver el # 7 en Reactivos y materiales necesarios que no se suministran). Si no se usa este tipo de pipeta o uno similar, se debe utilizar la técnica de pipeteo inverso (se describe brevemente en la Sección 7, Pipeteo inverso). Si desea más información, consulte las instrucciones del fabricante de la pipeta.
7. Los recuentos de microesferas en los tubos TruCOUNT varían según los lotes. Siempre se debe usar el recuento de microesferas del lote de tubos TruCOUNT que se esté utilizando, tanto cuando se introduzca ese valor en el software o bien cuando se calcule manualmente un recuento absoluto. No use

---

\* Patente de los EE.UU. Nos. 4.654.312; 4.902.613; y 5.098.849.

tubos de diferentes lotes en una misma prueba.

- Los tubos TruCOUNT están diseñados para utilizarse con un procedimiento específico de preparación de muestras de lisis sin lavado. No intente establecer límites en la dispersión frontal (FSC) para analizar los datos.

### **Almacenamiento y manipulación**

- Almacenar el reactivo a una temperatura entre 2° y 8°C. No usar después de la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta.
- El reactivo no se debe congelar ni exponer a la luz directa durante el almacenamiento o la incubación con las células. Mantener seco el vial del reactivo.
- Almacenar los tubos TruCOUNT en sus bolsitas originales a una temperatura entre 2° y 25°C. Para evitar la posible condensación, la bolsita se debe abrir solamente después que haya alcanzado la temperatura ambiente y se debe volver a cerrar cuidadosamente inmediatamente después de haber sacado un tubo. Se debe examinar el desecante cada vez que se abra la bolsita. Si el desecante ha cambiado de color azul a violeta, se debe desechar el resto de tubos. Los tubos se deben usar antes de haber transcurrido una hora tras haberlos sacado de la bolsita y no se deben usar más allá de la fecha de caducidad indicada en el envase.

### **5. INSTRUMENTO**

El reactivo MultiTEST CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 y los tubos TruCOUNT han sido diseñados para usarse en un citómetro de flujo con el equipo y el software adecuados. BD recomienda el citómetro de flujo FACSCalibur™ o el FACSort™. Sin embargo, los resultados se pueden obtener con otras plataformas. El citómetro de flujo deberá estar equipado con láser de 635 nm y de 488 nm que

sean capaces de detectar la luz dispersa (frontal y lateral) y la fluorescencia de cuatro colores con emisión que se pueda detectar en cuatro rangos: 515 a 545 nm, 562 a 607 nm, > 650 nm y 652 a 668 nm. El instrumento debe ser capaz de establecer umbrales o discriminar al usar el canal de > 650 nm. El cargador FACS Loader de BD también se puede utilizar con este producto.

BD recomienda usar las microesferas CaliBRITe™ y el software FACSComp™, versión 4.0 o posterior, para configurar los voltajes del tubo fotomultiplicador (PMT), la compensación entre fluorescencias y verificar la sensibilidad del instrumento antes de usarlo. Para los usuarios de citómetros de flujo fabricados por compañías que no sean BD, consulte las instrucciones del fabricante para la configuración de identificación inmuno-fenotípica con cuatro colores.

BD ha desarrollado aplicaciones de software como MultiSET que calculan automáticamente el recuento absoluto cuando se utilizan tubos TruCOUNT. Sin embargo, se puede usar otros softwares para la adquisición y el análisis de los datos y calcular manualmente los recuentos absolutos.

### **6. OBTENCION Y PREPARACION DE MUESTRAS**

La obtención de sangre se debe hacer en forma aséptica por punción venosa<sup>32,33</sup> en un tubo estéril de recolección de sangre VACUTAINER® K<sub>3</sub> EDTA (ácido etilenediaminotetraacético) (tapa lila). El reactivo MultiTEST CD3 FITC/CD16 + CD56 PE/CD45 PerCP/CD19 APC y los tubos TrueCOUNT han sido validados con las fórmulas líquida y seca de K<sub>3</sub> EDTA.

Para este procedimiento se requiere un mínimo de 100 µL de sangre entera. Es necesario seguir las instrucciones del fabricante del tubo sobre el volumen mínimo de sangre que se debe obtener

para cerciorarse de que se está usando adecuadamente; en especial cuando se van a determinar recuentos absolutos con microesferas en tubos TruCOUNT.

Se debe obtener un recuento de glóbulos blancos (WBC) y un recuento diferencial de la misma muestra de sangre entera antes de la tinción para estar seguros de que el recuento de WBC está dentro del rango lineal (ver la Sección 11, Características de rendimiento: linealidad) o para calcular recuentos absolutos a partir de los porcentajes celulares obtenidos.

La sangre anticoagulada y almacenada a temperatura ambiente (20° a 25°C) se debe teñir dentro de las 48 horas de obtenida y luego se debe analizar dentro de las 24 horas de haber sido teñida.

### **Interferencias**

No se deben usar muestras de pacientes que hayan sido fijadas y almacenadas previamente. Las muestras de sangre entera refrigeradas antes de teñirlas pueden dar resultados erróneos. Las muestras de pacientes que estén tomando medicamentos inmunosupresores pueden producir una mala resolución<sup>34</sup>. Los blastocitos pueden interferir con los resultados de la prueba. Las muestras con hemólisis se deben rechazar.

## **7. PROCEDIMIENTO**

### **Reactivo suministrado**

- MultiTEST CD3 FITC/CD16 + CD56 PE/CD45 PerCP/CD19 APC (BD, No. de catálogo 342416), o
- MultiTEST CD3 FITC/CD16 + CD56 PE/CD45 PerCP/CD19 APC con tubos TruCOUNT (BD, No. de catálogo 342446)

### **Reactivos y materiales necesarios que no se suministran**

1. Microesferas CaliBRITE 3 y APC (BD, Nos. de catálogo 340486 y 340487, respectivamente)
2. Solución lisante FACS (10X), 100 mL (BD, No. de catálogo 349202). Las instrucciones para diluir y las advertencias están en el folleto de instrucciones de la solución lisante FACS.
3. Agua de grado reactivo (destilada o desionizada).
4. Tubos VACUTAINER con K<sub>3</sub> EDTA para la recolección de sangre o equivalente.
5. Tubos de prueba desechables con tapa de poliestireno Falcon™ de 12 x 75 mm (BD, No. de catálogo 352058) o equivalente (si no se están usando los tubos TruCOUNT).
6. Agitador Vortex
7. Micropipeta con puntas (Pipeta electrónica BD, No. de catálogo 646539) o equivalente.
8. Dispensador o pipeta de 450 µL para dispensar la solución lisante FACS.
9. Líquido de revestimiento (FACSFlow™, BD, No. de catálogo 342003) o equivalente.
10. Controles TruCOUNT (BD, No. de catálogo 340335), necesarios si se usan los tubos TruCOUNT.
11. Control de sangre entera lisable (se puede obtener comercialmente)

### **Tinción de las células**

Después de la tinción se procede a lisar los glóbulos rojos con la solución lisante FACS diluida (1X). Se debe tener cuidado de proteger los tubos de la luz directa. El procedimiento se

debe llevar a cabo a temperatura ambiente (20° a 25°C). Ver las Precauciones en la Sección 4 y las Interferencias en la Sección 6.

### *Pipeteo inverso*

Para obtener los resultados, si se usan tubos TruCOUNT, es crítico que el volumen de sangre que se agregue sea exacto. Si no se utiliza la pipeta electrónica de BD o una pipeta similar que dispense un volumen exacto, se debe usar el pipeteo inverso. Esta técnica aprovecha dos toques en la pipeta.

- Para el pipeteo inverso, el botón se presiona hasta el segundo toque. Cuando se suelta el botón, el exceso de muestra asciende en la punta. Se expulsa un volumen preciso de la muestra al presionar el botón hasta el primer toque, dejando el exceso de muestra en la punta.

### *Tinción*

1. Para cada muestra de paciente, se debe rotular un tubo de 12 x 75 mm con el número de identificación de la muestra.

Para recuentos absolutos, se debe rotular un tubo TruCOUNT en lugar del tubo de 12 x 75 mm.

NOTA: Antes de usar los tubos, se debe verificar que el residuo de microesferas del tubo TruCOUNT esté intacto y dentro de la rejilla de metal del fondo del tubo. De no ser así, deseche el tubo TruCOUNT y reemplácelo con otro.

2. Pipetear 20 µL del reactivo MultiTEST CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 al fondo del tubo.

Si se usa un tubo TruCOUNT, pipetear justo por encima del retenedor de acero inoxidable. No se debe tocar el sedimento.

3. Pipetear 50 µL de sangre entera anticoagulada bien mezclada al fondo del tubo.

NOTA: Se debe evitar que la sangre descienda por las paredes del tubo. Si queda sangre entera en las paredes del tubo, el reactivo no la teñirá.

Si se está usando un tubo TruCOUNT, la exactitud es crítica. Se debe usar la técnica de pipeteo inverso para pipetear una muestra en el lado del tubo justo por encima del retenedor.

4. Tapar el tubo y agitarlo suavemente en el Vortex para que se mezcle. Incubar 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20° a 25°C).
5. Añadir 450 µL de solución lisante FACS 1X al tubo.
6. Tapar el tubo y agitarlo suavemente en el Vortex para que se mezcle. Incubar 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20° a 25°C). La muestra está ahora lista para el análisis en el citómetro de flujo.

### *Citometría de flujo*

Si las muestras no se analizan inmediatamente después de la preparación, se deben almacenar en la oscuridad a temperatura ambiente (20° a 25°C).

Agitar bien las células (a baja velocidad) para disminuir la agregación antes de procesarlas en el citómetro de flujo<sup>35</sup>. Si está usando el cargador FACS Loader, agite los tubos en el Vortex justo antes de colocarlos en la gradilla del cargador. Adquirir y analizar los datos en la modalidad de lista con el software MultiSET o CellQuest. Antes de la adquisición de muestras, se debe ajustar el umbral para reducir al mínimo los restos celulares y asegurarse de que estén incluidas las poblaciones que interesan.

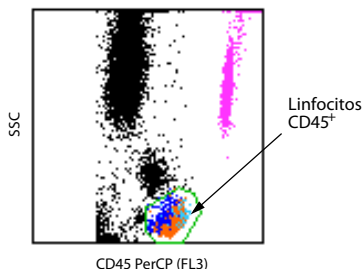
## Control de calidad

Procese diariamente una muestra de control de un sujeto adulto normal o un control de sangre entera obtenido comercialmente para optimizar la calibración del instrumento y como una forma de control de calidad del sistema<sup>33</sup>.

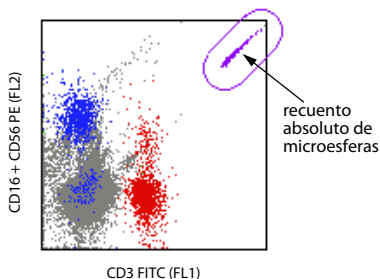
Para evaluar el rendimiento del sistema, se deben usar, en cada grupo de muestras, controles obtenidos comercialmente que tengan valores establecidos de porcentajes positivos y recuentos absolutos.

Al inspeccionar visualmente la gráfica de puntos de CD45 frente a SSC, la población de linfocitos debe tener el aspecto de un agregado compacto y brillante con baja SSC. Los monocitos y granulocitos también deben tener el aspecto de agregados definidos. No se debe proceder con el análisis si las poblaciones están difusas y hay muy poca o ninguna separación entre los agregados.

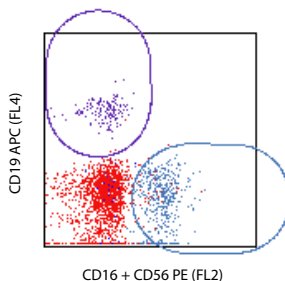
Ver las Figuras 1, 2 y 3 que tienen datos representativos de una muestra de un sujeto adulto hematológicamente normal teñida con CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 en un tubo TruCOUNT.



**Figura 1** Identificación de linfocitos en una gráfica de puntos de CD45 frente a SSC



**Figura 2** Recuento absoluto de eventos de microesferas en tubos TruCOUNT en una gráfica de puntos de CD3 frente a CD16 + CD56



**Figura 3** Identificación de linfocitos B en una gráfica de puntos de CD16 + CD56 frente a CD19

## 8. RESULTADOS

Los resultados se informan como el porcentaje de células positivas por población de linfocitos o como número de células positivas por microlitro de sangre (recuento absoluto).

### *Cálculo de los recuentos absolutos*

Durante el análisis, el número absoluto (células/ $\mu$ L) de células positivas en la muestra se puede determinar al comparar los eventos celulares con los eventos de microesferas. Si se usa el software MultiSET, éste determinará los recuentos absolutos. Para hacer los cálculos a mano cuando se usa CellQuest u otro software,

simplemente se divide el número de eventos celulares positivos entre el número de eventos de microesferas, y luego se multiplica por la concentración de microesferas en el tubo TruCOUNT:

$$\frac{\text{Número de eventos en la región que contiene la población celular}}{\text{Número de eventos en recuento absoluto en la región de microesferas}} \times \frac{\text{Número de microesferas por prueba}^*}{\text{Volumen probado}} = \text{Recuento absoluto de la población celular}$$

\* Este valor se encuentra en la bolsa de papel metálico del tubo TruCOUNT para recuento absoluto y puede variar de un lote a otro.

## 9. LIMITACIONES

- Los laboratorios deben establecer sus propios rangos normales de referencia para los parámetros del reactivo MultiTEST CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 que puedan estar influenciados por el sexo y la edad del paciente así como por la técnica de preparación. La raza del paciente también puede tener un efecto<sup>36</sup>, sin embargo no se dispone de suficientes datos para establecerlo. Cuando se determine un rango de referencia se deben conocer la edad, el sexo, las características clínicas y la raza de los pacientes<sup>37</sup>. Los rangos de referencia se dan sólo como información.
- El reactivo MultiTEST CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 no ha sido validado para ser usado con heparina o dextrosa de ácido cítrico (ACD) líquida como anticoagulantes en la determinación de recuentos absolutos con los tubos TruCOUNT.
- El reactivo MultiTEST CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 no se debe usar para examinar muestras a fin de detectar la presencia de células leucémicas o para usarlo en la determinación del fenotipo de muestras de pacientes con leucemia.
- Puede ser que no sean comparables los recuentos absolutos obtenidos en

laboratorios que utilicen equipo de diferentes fabricantes.

## 10. VALORES ESPERADOS

### Rangos de referencia

Los rangos de referencia para CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 que se muestran en la Tabla 1 se determinaron en tres centros de investigación clínica en los Estados Unidos. Los sujetos fueron adultos hematológicamente normales cuya edad variaba entre 18 y 65 años. Para mayor información sobre rangos de referencia, consulte la primera limitación sobre los mismos.

**Tabla 1. Rangos de referencia representativos con CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19**

Subpoblación	n	Media	Rango 95 %
Linfocitos asesinos naturales (NK) (%)	164	13	5–26
Linfocitos B (%)	164	14	5–22
Linfocitos T (%)	164	72	56–86
Linfocitos asesinos naturales (células/ $\mu$ L)	164	267	84–724
Linfocitos B (células/ $\mu$ L)	164	293	80–616
Linfocitos T (células/ $\mu$ L)	164	1507	754–2764

## 11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

El rendimiento de los reactivos se estableció al someterlos a pruebas en los laboratorios de BD Biosciences en San José, California, y en tres laboratorios clínicos en los Estados Unidos.

### Exactitud

Las numeraciones porcentuales y los recuentos absolutos de las subpoblaciones de linfocitos con MultiTest CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 en tubos TruCOUNT se compararon con los resultados obtenidos con TriTEST CD3/CD16 + CD56/CD45, o CD3/CD19/CD45 en tubos TruCOUNT.

Se obtuvieron al azar muestras de sangre entera de donantes normales y de donantes con anomalías en dos laboratorios clínicos y se evaluaron en ambos sistemas. Los resultados estadísticos del análisis de regresión se presentan en la Tabla 2 y fueron substancialmente equivalentes.

**Tabla 2. Análisis de regresión**

Subpoblación	n	R	Pendiente	Intersección	Rango
Linfocitos asesinos naturales (NK) (%)	126	0,97	0,97	-0,85	3-40,0
Linfocitos B (%)	126	0,99	0,98	-0,25	0-59
Linfocitos T (%)	126	0,99	0,99	1,74	21,5-90,0
Linfocitos asesinos naturales (células/ $\mu$ L)	126	0,96	0,92	-5,44	37-901
Linfocitos B (células/ $\mu$ L)	126	0,98	0,95	1,77	3-877,6
Linfocitos T (células/ $\mu$ L)	126	0,98	1,01	-10,18	100-2883

### Reproducibilidad intramuestra

La reproducibilidad intramuestra se determinó en tres laboratorios clínicos por quintuplicado en muestras obtenidas de donantes normales y donantes anormales. En las Tablas 3 y 4 se presentan las medias, las desviaciones estándar (DE) y/o los coeficientes de variación (CV) de los porcentajes y recuentos absolutos de las subpoblaciones, cuando los recuentos eran mayores que 100 células/ $\mu$ L.

**Tabla 3. Reproducibilidad intramuestra de los porcentajes de las subpoblaciones**

Subpoblación	n	Media (%)	DE
Linfocitos asesinos naturales	46	10,8	0,73
Linfocitos B	46	15,6	0,71
Linfocitos T	46	72,1	0,99

**Tabla 4. Reproducibilidad intramuestra de los recuentos absolutos**

Subpoblación	n	Media (células/ $\mu$ L)	% CV
Linfocitos asesinos naturales	33	217	8,3
Linfocitos B	37	278	5,8
Linfocitos T	46	1217	4,7

### Estabilidad

La estabilidad de los reactivos MultiTEST en los tubos TruCOUNT se evaluó al estudiar: 1) los cambios asociados con el almacenamiento de la sangre entera antes de la tinción, 2) los cambios como resultado del tiempo que transcurre entre la tinción y la adquisición de datos, y 3) el efecto combinado de ambos. Las muestras de sangre entera se estudiaron hasta 48 horas después de haberlas obtenido y las muestras teñidas hasta 24 horas después de la tinción. Todas las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (20°C a 25°C) antes de la tinción o adquisición.

En base a los resultados de este estudio\*, BD recomienda teñir las muestras dentro de las 48 horas de obtenidas y analizar las muestras dentro de las 24 horas de la tinción.

### Reactividad cruzada

El antígeno CD16 se expresa en los neutrófilos<sup>2</sup>. El antígeno CD56 está presente en aproximadamente el 5% de los linfocitos CD3<sup>+</sup> de sangre periférica<sup>2</sup>.

### Linealidad

La linealidad se evaluó con concentraciones de glóbulos blancos de  $0,2 \times 10^3$  a  $29,7 \times 10^3$  WBC/ $\mu$ L y concentraciones de linfocitos de  $0,1 \times 10^3$  a  $9,0 \times 10^3$  linfocitos/ $\mu$ L. Se observó que los resultados eran lineales dentro de los

\* Los datos están a su disposición en BD Biosciences



rangos de CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>.

## GARANTÍA

Este producto está garantizado sólo en cuanto a su conformidad con la cantidad y el contenido indicados en la etiqueta en el momento de la entrega al cliente. No hay otras garantías, explícitas o implícitas, más allá de lo indicado en la etiqueta del producto. La única responsabilidad de BD se limita a la sustitución del producto o el reembolso del precio de compra. BD no se hace responsable de los daños materiales o personales ni de las pérdidas económicas causados por este producto

## BIBLIOGRAFICA

1. Fitzgerald-Bocarsly P, Herberman R, Hercend T, et al. A definition of natural killer cells. In: Ades E, Lopez C, eds. *Natural Killer Cells and Host Defense*. Basel: Karger; 1989:1.
2. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1986;136:4480-4486.
3. Schmidt RE. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. *Blut*. 1989;59:200-206.
4. Nicholson JKA. Use of flow cytometry in the evaluation and diagnosis of primary and secondary immunodeficiency diseases. *Arch Pathol Lab Med*. 1989;113:598-605.
5. Foucar K, Goeken JA. Clinical application of immunologic techniques to the diagnosis of lymphoproliferative and immunodeficiency disorders. *Lab Med*. 1982;13:403-413.
6. Cohen SB, Weetman AP. Activated interstitial and intraepithelial thyroid lymphocytes in autoimmune thyroid disease. *Acta Endocrinol*. 1988;119:161-166.
7. Smolen JS, Chused TM, Leiserson WM, Reeves JP, Alling D, Steinberg AD. Heterogeneity of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: correlation with clinical features. *Am J Med*. 1982;72:783-790.
8. Nicholson JKA, Jones BM, Hubbard M. CD4 T lymphocyte determinations on whole blood specimens using a single-tube three-color assay. *Cytometry*. 1993;14:685-689.
9. Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J. Three-color supplement to the NIAID DAIDS guideline for flow cytometric immunophenotyping. *Cytometry*. 1996;26:227-230.
10. Nicholson JKA, Hubbard M, Jones BM. Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Cytometry*. 1996;26: 16-21.

11. Haynes BF. Summary of T-cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986:3-30.
12. Kan EAR, Wang CY, Wang LC, Evans RL. Noncovalently bonded subunits of 22 and 28 kd are rapidly internalized by T cells reacted with Anti-Leu-4 antibody. *J Immunol*. 1983;131:536-539.
13. Knowles RW. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:259-288.
14. Perussia B, Acuto O, Terhorst C, et al. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions, II: studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane. *J Immunol*. 1983;130:2142-2148.
15. Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions, I: characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J Immunol*. 1983;130:2133-2141.
16. Schmidt RE. Non-lineage/natural killer section report: new and previously defined clusters. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:517-542.
17. Ritz J, Trinchieri G, Lanier LL. NK-cell antigens: section report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, eds. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1995;2:1367-1372.
18. Cobbold SP, Hale G, Waldmann H. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In: McMichael AJ, ed. *Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:788-803.
19. Nadler LM. B Cell/Leukemia Panel Workshop: summary and comments. In: Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leucocyte Typing II: Human T Lymphocytes*. New York, NY: Springer-Verlag; 1986;2:3-43.
20. van Dongen JJM, Krissansen GW, Wolvers-Tettero ILM, et al. Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood*. 1988;71:603-612.
21. Brenner MB, McClean J, Dialynas DP, et al. Identification of a putative second T cell receptor. *Nature*. 1986;322:145-149.
22. Clevers H, Alarcón B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol*. 1988;6:629-662.

23. Perussia B, Trinchieri G, Jackson A, et al. The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J Immunol.* 1984;133:180-189.
24. Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol.* 1991;146:4421-4426.
25. Schubert J, Lanier LL, Schmidt RE. Cluster report: CD56. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:699-702.
26. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science.* 1987;236:799-806.
27. Schwinzer R. Cluster report: CD45/CD45R. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:628-634.
28. Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G. B-cell antigens: CD19. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989:34-36.
29. Centers for Disease Control. Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR.* 1988;37:377-388.
30. *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue: Tentative Guideline*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document M29-T2.
31. Nicholson JK, Browning SW, Orloff SL, McDougal JS. Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1993;160:215-218.
32. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture: Approved Standard*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document H3-A3.
33. *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes; Tentative Guideline*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1992. NCCLS document H42-T.
34. Giorgi JV. Lymphocyte subset measurements: significance in clinical medicine. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:236-246.
35. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.
36. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol.* 1985;3(1):33-37.
37. *How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory: Approved Guideline*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1992. NCCLS document C28-A.

## BD Trucount™ Tubes

For determining absolute counts of leucocytes in blood

25 Tubes—Catalog No. 340334

02/2015

23-3483-07

IVD



BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD



**Becton, Dickinson and Company**  
**BD Biosciences**  
2350 Qume Drive  
San Jose, CA 95131 USA



**Benex Limited**  
Pottery Road, Dun Laoghaire,  
Co. Dublin, Ireland  
Tel +353.1.202.5222  
Fax +353.1.202.5388

**BD Biosciences**  
**European Customer Support**  
Tel +32.2.400.98.95  
Fax +32.2.401.70.94  
help.biosciences@europe.bd.com

**Becton Dickinson Pty Ltd,**  
4 Research Park Drive,  
Macquarie University Research Park,  
North Ryde NSW 2113, Australia

**Becton Dickinson Limited,**  
8 Pacific Rise, Mt. Wellington,  
Auckland, New Zealand

bdbiosciences.com  
ClinicalApplications@bd.com

### 1. INTENDED USE

BD Trucount™ tubes are used for determining absolute counts of leucocytes in blood.

BD Trucount tubes are designed for use with in vitro diagnostic products such as BD Tritest™ reagents, and a suitably equipped flow cytometer. BD Trucount tubes can be used with the BD FACSTM Loader.

### 2. PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Procedures described in this instructions for use (IFU) apply to immunophenotyping applications. For other applications, refer to the appropriate product-specific IFU.

Add the appropriate monoclonal antibody reagent and whole blood directly to the BD Trucount tube. The lyophilized pellet in the tube dissolves, releasing a known number of fluorescent beads. During analysis, the absolute number (cells/μL) of positive cells in the sample can be determined by comparing cellular events to bead events. If the appropriate software, such as BD Multiset™, is used, absolute counts will be determined by the software. If you are manually performing data analysis using software such as BD CellQuest™, simply divide the number of positive cellular events by the number of bead events, then multiply by the BD Trucount™ bead concentration.

### 3. REAGENT

Each pouch contains 25 BD Trucount tubes, sufficient for 25 tests.

#### Precautions

- For In Vitro Diagnostic Use.

- BD Trucount tubes are designed for use with a specific lyse/no-wash procedure. For absolute counting, prepare and analyze samples within BD Trucount tubes. Do not transfer beads to another tube. The presence of proteins, such as serum proteins contained in whole blood, is necessary for proper performance of BD Trucount beads in absolute counting.<sup>1</sup> Follow specific assay IFUs when diluting samples. **Do not attempt to threshold on forward scatter (FSC) for data collection.** Do not remove the metal retainer in the BD Trucount tube.
- It is the responsibility of the user to validate any other method or use.
- The addition of a precise volume of blood is critical to achieving the result. Pipettes must be calibrated to deliver exactly 50 µL of sample. If this or a similar type of pipette is not used, perform the reverse pipetting technique (see Reverse Pipetting in Section 6 for a brief description). Refer to the pipette manufacturer's instructions for more information.
- Always be sure to use the bead count from the current lot of BD Trucount tubes when entering this value in the software or when manually calculating an absolute count. The correct bead count is critical for determining a cell count. Do not mix multiple lots of tubes in the same assay.
- Store BD Trucount tubes in their original foil pouch at 2°C–25°C. To avoid potential condensation, open the pouch only after it has reached room temperature and carefully reseal the pouch immediately after removing a tube. Examine the desiccant each time you open the pouch. If the desiccant has

turned from blue to lavender, discard the remaining tubes. Use tubes within 1 hour after removal from the foil pouch and do not use beyond the expiration date indicated on the packaging.

**WARNING** All biological specimens and materials coming in contact with them are considered biohazards. Handle as if capable of transmitting infection<sup>2,3</sup> and dispose of with proper precautions in accordance with federal, state, and local regulations. Never pipette by mouth. Wear suitable protective clothing, eyewear, and gloves.

BD FACSTM lysing solution is required and contains diethylene glycol and formaldehyde. Refer to the *BD FACS Lysing Solution* instructions for use for warnings.

#### 4. INSTRUMENT

BD Trucount applications are designed for flow cytometers equipped with appropriate computer hardware and software. The flow cytometer must be equipped to detect three-color fluorescence, forward scatter (FSC), and side scatter (SSC). We recommend the BD FACSCalibur™ flow cytometer; however, results can be achieved using other platforms. Refer to the appropriate reagent IFU for specific instrument limitations. The BD FACS Loader can also be used with this product. BD has developed BD Multiset software, for use with specific reagents and BD Trucount tubes, which automatically calculates absolute counts. However, you can also use software such as BD CellQuest for data acquisition and analysis and manually calculate absolute counts.

## 5. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Collect blood aseptically by venipuncture<sup>4,5</sup> into a sterile EDTA (lavender top) BD Vacutainer® blood collection tube. Follow the collection tube manufacturer's guidelines for the minimum volume of blood to be collected. Store anticoagulated blood at room temperature (20°C–25°C) until ready for staining.

## 6. PROCEDURE

### Reagent Provided

BD Trucount tubes (Catalog No. 340334), containing a freeze-dried pellet of fluorescent beads in a single-use tube.

### Reagents and Materials Required but Not Provided

- BD FACSCComp™ beads. Refer to your product catalog for information on the specific BD FACSCComp product for your application.
- BD FACS lysing solution (10X), 100 mL (Catalog No. 349202). Refer to the *BD FACS Lysing Solution* IFU for dilution instructions and warnings.
- Reagent-grade (distilled or deionized) water.
- EDTA BD Vacutainer blood collection tubes (Catalog No. 356457), or equivalent.
- Vortex mixer.
- Micropipettor with tips.
- Bulk dispenser or pipettor (450 µL) for dispensing BD FACS lysing solution.
- BD FACSCFlow™ sheath fluid (Catalog No. 342003) or equivalent.

- BD Trucount™ Controls (Catalog No. 340335).

### Staining the Cells

Stain whole blood samples following specific instructions in the appropriate reagent IFU. Lyse red blood cells after staining using diluted (1X) BD FACS lysing solution. Use care to protect the tubes from direct light. Perform the procedure at room temperature (20°C–25°C).

### Reverse Pipetting

A precise volume of whole blood is critical. If a pipette that delivers a precise volume of blood is not used, perform reverse pipetting. This technique takes advantage of two stops in a pipette.

- For normal pipetting, typically, the button is depressed to the first stop; sample is drawn up by releasing the button, then expelled by pressing to the first stop again.
- For reverse pipetting, the button is depressed to the second stop. When the button is released, excess sample is drawn up into the tip. A precise volume of sample is expelled by pressing the button to the first stop, leaving excess sample in the tip.

### Staining

Refer to the appropriate reagent IFU for detailed sample preparation instructions.

1. For each patient sample, label a BD Trucount tube with the reagent and sample identification number.

**NOTE** Before use, verify that the BD Trucount bead pellet is intact and within the metal retainer at the bottom of the tube. If this is not the case, discard the BD Trucount tube and replace it with another.

- Pipette 20  $\mu$ L of the appropriate reagent just above the stainless steel retainer. Do not touch the pellet.
- Pipette 50  $\mu$ L of well-mixed, anticoagulated whole blood onto the side of the tube just above the retainer.

**NOTE** Avoid smearing blood down the side of the tube. If whole blood remains on the side of the tube, it will not be stained with the reagent.

Accuracy is critical. Use a BD electronic pipette or use the reverse pipetting technique to pipette sample onto the side of the tube just above the retainer.

- Cap the tube and vortex gently to mix. Incubate for 15 minutes in the dark at room temperature (20°C–25°C).
- Add 450  $\mu$ L 1X BD FACS lysing solution to the tube.
- Cap the tube and vortex gently to mix. Incubate for 15 minutes in the dark at room temperature. The sample is now ready to be analyzed on the flow cytometer.

## Flow Cytometry

Refer to the appropriate reagent IFU for specific instructions. Vortex the samples thoroughly (at low speed) to resuspend beads and reduce cell aggregation before running them on the flow cytometer.<sup>6</sup> If using the BD FACS Loader for acquisition, vortex tubes immediately before placing them into the Loader racks. Acquire and analyze list-mode data using the appropriate software.

We recommend using BD FACSComp™ beads and the appropriate software such as BD FACSComp™, version 2.0 or later, for setting the photomultiplier tube (PMT)

voltages, setting the fluorescence compensation, and checking instrument sensitivity prior to use.

Before acquiring samples, adjust the threshold to minimize debris and ensure populations of interest are included. Figures 1, 2, and 3 show an example of BD Trucount tubes used with BD Tritest™ CD3/CD4/CD45 reagent.

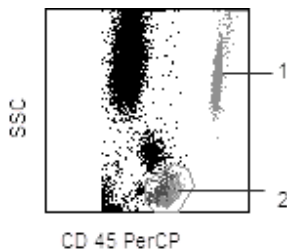
If you are not using a BD software program that automatically calculates absolute cell counts, you can obtain the absolute count of the cell population (A), by dividing the number of positive cell events (X) by the number of bead events (Y), and then multiplying by the BD Trucount bead concentration (N/V, where N = number of beads per test\* and V = test volume).  $A = X/Y \times N/V$

Gate the lymphocyte population (2) from an FL3 vs SSC dot plot. Then, obtain the number of events in the quadrant or region containing the cell population from a gated FL1 vs FL2 dot plot (see Figure 2). Obtain the number of events in the absolute count bead (1) region from an ungated FL1 vs FL2 dot plot (see Figure 3).

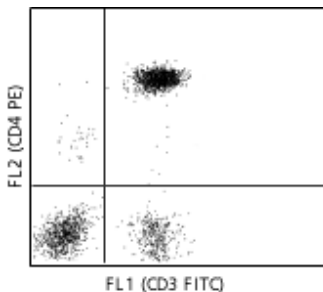
---

\* This value is found on the BD Trucount tube foil pouch label and might vary from lot to lot.

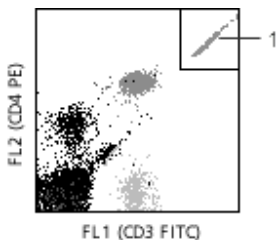
**Figure 1** FL3 (CD45) vs SSC dot plot



**Figure 2** Gated FL1 vs FL2 dot plot



**Figure 3** Ungated FL1 vs FL2 dot plot



### Quality Control

Run a control sample daily from a normal adult subject to optimize instrument

settings and as a quality control check of the system.<sup>5</sup>

Visually inspect the CD45 vs SSC dot plot. The lymphocyte population should appear as a bright, compact cluster with low SSC. Monocytes and granulocytes should also appear as distinct clusters. Do not proceed with analysis if populations are diffuse and there is little or no separation between clusters.

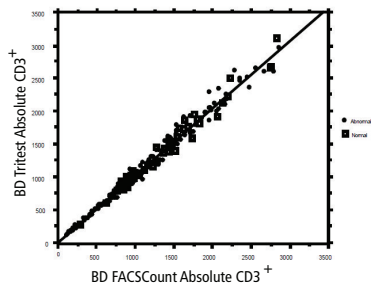
## 7. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Performance was established by comparison with the BD FACSCount™ system. These results with BD Tritest CD3/CD4/CD45 are representative of results obtained with other IVD phenotyping reagents. Refer to specific reagent IFUs for more details.

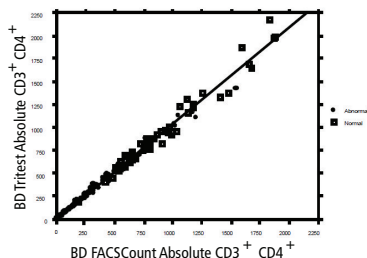
### Accuracy

Whole blood was stained with BD Tritest CD3/CD4/CD45 using BD Trucount tubes and acquired and analyzed using BD CellQuest software. Two samples of each specimen were stained and analyzed in parallel using the BD FACSCount system. Data was analyzed to determine the average differences between the results obtained using BD Tritest/BD Trucount versus results with BD FACSCount. The results appear in Figure 4 and Figure 5, and Table 1 and Table 2.

**Figure 4** BD FACSCount results versus BD Tritest/  
BD Trucount results



**Figure 5** BD FACSCount results versus BD Tritest/  
BD Trucount results



**Table 1** Regression Analysis: BD Tritest CD3+  
(cells/ $\mu$ L) vs BD FACSCount CD3+

Parameter	Parameter Estimate	90% Lower Confidence Limit	90% Upper Confidence Limit
Y-intercept	-7.0	-28	14
Slope	1.03	1.01	1.04

$r = 0.99$ ;  $n = 197$

**Table 2** Regression analysis: BD Tritest CD3+CD4+  
(cells/ $\mu$ L) vs BD FACSCount CD3+CD4+

Parameter	Parameter Estimate	90% Lower Confidence Limit	90% Upper Confidence Limit
Y-intercept	1.2	-6.7	9.1
Slope	1.04	1.03	1.06

$r = 0.99$ ;  $n = 199$

## Precision

A study using ten replicates each of a low, medium, and high sample was performed to assess reproducibility. The results appear in Table 3.

**Table 3** Reproducibility: BD Trucount with  
BD Tritest CD3/CD4/CD45

Sample	n	Subset	Mean	CV% <sup>a</sup>
Low	10	CD3+	704	7.0
		CD3+CD4+	371	7.1
Medium	10	CD3+	1,897	4.1
		CD3+CD4+	1,352	3.9
High	10	CD3+	2,716	4.4
		CD3+CD4+	2,034	4.2

a. CV = coefficient of variation

Precision studies were also performed at three external clinical sites to assess absolute count within-sample reproducibility for normal and abnormal samples. For each sample, three aliquots of whole blood were stained with BD Tritest reagents using BD Trucount tubes. Examples of randomly selected



results for individual subjects appear in Table 4.

**Table 4 CD3/CD4/CD45 with BD Trucount representative samples (cells/ $\mu$ L, n = 3)**

Table 4a: Site 1						
	Mean CD4	SD <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>	Mean CD3	SD <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>
Low	10.0	3.8	38.4	287	3.9	1.4
	209	11.1	5.3	1,206	21.3	1.8
	427	32.2	7.5	3,051	181.2	5.9
Med	502	34.6	6.9	1,784	97.5	5.5
	701	16.6	2.4	926	15.5	1.7
	961	102.1	10.6	3,319	252.9	7.6
High	1,129	42.7	3.8	2,184	71.3	3.3
	1,142	45.1	4.0	1,925	80.8	4.2

- a. SD = standard deviation  
b. CV = coefficient of variation

Table 4b: Site 2						
	Mean CD4	SD <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>	Mean CD3	SD <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>
Low	86	7.6	8.9	768	29.5	3.8
	266	24.6	9.2	1,047	53.5	5.1
	422	23.3	5.5	3,533	247.6	7.0
Med	517	12.3	2.4	1,083	7.0	0.6
	689	27.7	4.0	1,623	126.5	7.8
	903	45.4	5.0	1,589	67.6	4.3
High	1,197	93.4	7.8	2,254	149.8	6.6
	1,201	37.4	3.1	1,758	40.5	2.3
	1,363	66.7	4.9	2,330	115.5	5.0

- a. SD = standard deviation  
b. CV = coefficient of variation

Table 4c: Site 3						
	Mean CD4	SD <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>	Mean CD3	SD <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>
Low	10	1.0	10.4	267	10.5	4.0
	49	3.2	6.4	1,385	80.2	5.8
	236	11.7	5.0	1,748	46.6	2.7

Table 4c: Site 3						
	Mean CD4	SD <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>	Mean CD3	SD <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>
Med	715	16.8	2.3	2,214	64.2	2.9
	878	40.3	4.6	1,328	49.9	3.8
	947	61.1	6.4	1,590	120.1	7.6
High	1,056	43.5	4.1	2,904	164.5	5.7
	1,299	79.0	6.1	1,970	121.8	6.2
	1,502	65.3	4.3	2,303	63.6	2.8

- a. SD = standard deviation  
b. CV = coefficient of variation

At these clinical sites, the range of CVs for CD3+ cells, observed for all samples, was <1% (count of 1,083 cells/ $\mu$ L) to 13% (count of 187 cells/ $\mu$ L). The range of CVs for CD3+CD4+ cells, observed for all samples, was <1% (count of 271 cells/ $\mu$ L) to 80% (count of 24 cells/ $\mu$ L).

Refer to the appropriate reagent IFU for more information about specific reagent performance.

## WARRANTY

Unless otherwise indicated in any applicable BD general conditions of sale for non-US customers, the following warranty applies to the purchase of these products.

THE PRODUCTS SOLD HEREUNDER ARE WARRANTED ONLY TO CONFORM TO THE QUANTITY AND CONTENTS STATED ON THE LABEL OR IN THE PRODUCT LABELING AT THE TIME OF DELIVERY TO THE CUSTOMER. BD DISCLAIMS HEREBY ALL OTHER WARRANTIES, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR ANY PARTICULAR PURPOSE AND NON-INFRINGEMENT. BD'S SOLE LIABILITY IS LIMITED TO EITHER REPLACEMENT OF THE PRODUCTS OR REFUND OF THE PURCHASE PRICE. BD IS NOT LIABLE FOR PROPERTY DAMAGE OR ANY INCIDENTAL OR CONSEQUENTIAL DAMAGES, INCLUDING PERSONAL INJURY, OR ECONOMIC LOSS, CAUSED BY THE PRODUCT.

## REFERENCES

1. Brando B, Göhde W Jr, Scarpati B, D'Avanzo G. The "vanishing counting bead" phenomenon: effect on absolute CD34+ cell counting in phosphate-buffered saline-diluted leukapheresis samples. *Cytometry*. 2001;43:154-160.
2. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Acquired*

*Guidelines—Third Edition*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. CLSI document M29-A3.

3. Centers for Disease Control. Perspectives in disease prevention and health promotion update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR*. 1988;37:377-388.
4. *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard—Sixth Edition*; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document GP41-A6.
5. Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007. CLSI document H42-A2.
6. Jackson AL, Warner NL. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In: Rose NR, Friedman H, Fahey JL, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1986:226-235.